

15.10.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 6月30日
Date of Application:

REC'D 09 DEC 2004

出願番号 特願2004-194088
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2004-194088]

WIPO PCT

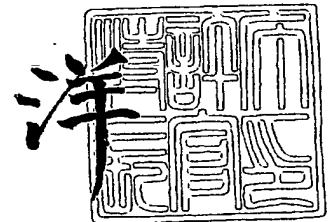
出願人 北興化学工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3107474

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-C40677
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 7/18
C12N 15/53

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県座間市立野台1丁目4番6号サンライズ立野台101
【氏名】 山口 将憲

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市神奈川区鳥越32番地9号
【氏名】 市川 稚子

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25号201
【氏名】 高橋 篤

【特許出願人】
【識別番号】 000242002
【氏名又は名称】 北興化学工業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100100549
【弁理士】
【氏名又は名称】 川口 嘉之
【電話番号】 03-3669-6571
【連絡先】 担当

【選任した代理人】
【識別番号】 100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 192372
【納付金額】 16,000円

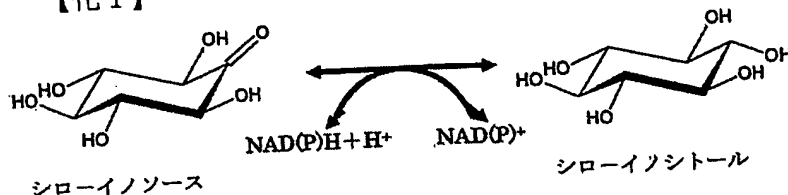
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記の理化学的性質を有するシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。
 反応：化 1 に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADH または NADPH 存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

【化 1】



【請求項 2】

さらに、下記の理化学的性質を有する、請求項 1 に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

- | | |
|----------------|---|
| (1) 分子量および会合特性 | : 38~46 k ダルトン、2 または 3 量体を形成する。 |
| (2) 補酵素 | : NAD^+ 若しくは NADP^+ 又は NADH 若しくは NADPH を補酵素とする。 |
| (3) 活性化重金属 | : Co^{2+} イオンの存在下で活性化される。 |
| (4) 阻害重金属 | : Sn^{2+} イオンの存在下で阻害される。 |
| (5) 至適 pH | : pH 5 ~ 9 で活性を有する。 |

【請求項 3】

以下の (a) または (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 に記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADH または NADPH 存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 4】

以下の (a) または (b) のタンパク質をコードする DNA。

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12 または 14 に記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADH または NADPH 存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

以下の (a) または (b) の DNA。

(a) 配列番号 1、3、5、7、9、11 または 13 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(b) 配列番号 1、3、5、7、9、11 または 13 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有する DNA とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADH または NADPH 存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】

請求項 4 または請求項 5 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。

【請求項 7】
請求項 4 または請求項 5 のいずれかに記載の DNA、または請求項 6 記載のベクターを保持する形質転換微生物。

【請求項 8】
形質転換する宿主が大腸菌である請求項 7 記載の形質転換微生物。

【請求項 9】
請求項 7 または 8 のいずれかに記載の形質転換微生物を培養し、培養物から請求項 1 に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする、シロイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

【請求項 10】
請求項 1 に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼと、 NAD^+ または NADP^+ 存在下でミオーイノシトールを酸化しシロイノソースを生成する反応を触媒するミオーイノシトール 2-デヒドロゲナーゼ (EC 1. 1. 1. 18) とを共存させた溶液中で、pH 6.0 ~ 8.5 で、 NAD^+ または NADP^+ 存在下で、ミオーイノシトールを基質として、シロイノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする、シロイノシトールの製造方法。

【請求項 11】
請求項 10 に記載の溶液中に、シロイノソースを 0.01 ~ 3% になるように添加することを特徴とする、請求項 10 に記載のシロイノシトールの製造方法。

【請求項 12】
請求項 10 に記載の溶液中に、シロイノソースを 0.2 ~ 0.5% になるように添加することを特徴とする、請求項 10 に記載のシロイノシトールの製造方法。

【請求項 13】
請求項 10 に記載の溶液中に、Co 塩および/または、Mg 塩を 0.01 ~ 5.0mM になるように添加することを特徴とする、請求項 10 に記載のシロイノシトールの製造方法。

【請求項 14】
請求項 10 に記載の溶液中に、Co 塩および/または、Mg 塩を 0.2 ~ 2.0mM になるように添加することを特徴とする、請求項 10 に記載のシロイノシトールの製造方法。

【請求項 15】
請求項 10 に記載の溶液中のミオーイノシトール濃度が 5 ~ 22% になるように調製し、酵素反応で生成したシロイノシトールを反応溶液中で結晶化させ、シロイノシトールを系外に結晶として、ろ別することを特徴とする、請求項 10 に記載のシロイノシトールの製造方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼとそれをコードするDNA、及び、当該酵素を利用したシロイノシトール製造方法

【技術分野】

【0001】

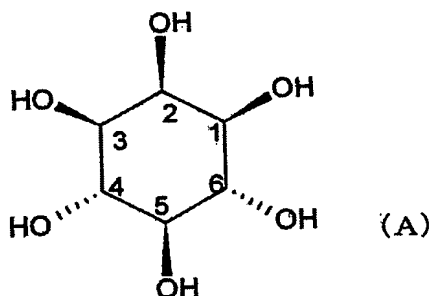
本発明は、新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼとそれをコードするDNA、及び、当該酵素を利用したシロイノシトール (scyllo-Inositol) を効率良く製造する方法に関する。更に詳しくは、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼとそれをコードするDNA、及び、当該酵素を利用したシロイノシトールを効率良く製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ミオイノシトールは次の平面式 (A)

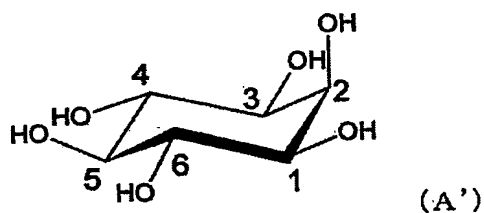
【化1】



【0003】

または次の立体構造式 (A')

【化2】

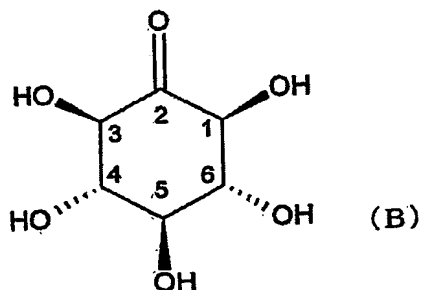


で表される天然に産する既知の物質である。

【0004】

また、シロイノソースは次の平面式 (B)

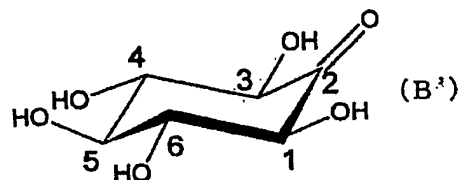
【化3】



【0005】

または次の立体構造式 (B')

【化4】

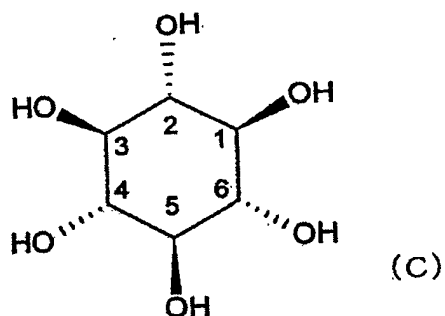


で表される既知の物質である。

【0006】

さらに、シロイノシトールは次の平面式 (C)

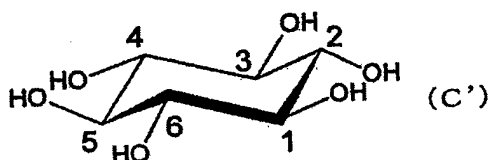
【化5】



【0007】

または次の立体構造式 (C')

【化6】



で表される既知の化合物である。

【0008】

シロイノシトールはミオイノシトールの立体異生体の一つで動物・植物中に広く見出される物質である。

シロイノシトールはアルツハイマー病の治療薬 (非特許文献1 参照) や、生理活性物質の合成原料 (特許文献1 参照)、液晶化合物の合成原料 (特許文献2 参照) としての用途が期待されている物質である。

【0009】

化学合成的手法によるシロイノシトールの製法としては、(1) ヘキサヒドロキシベンゼンをラネーニッケルで還元し、シロイノシトールを得る方法 (非特許文献2 参照)。(2) グルコフラノース誘導体から5段階の反応でシロイノソースを得て還元し、シロイノシトールを得る方法 (非特許文献3 参照)。(3) シスートリオキサートリソースホモベンゼンを原料に4段階以上の反応でシロイノシトールを得る方法 (非特許文献4 参照)。(4) ミオイノシトールを白金触媒で酸化しシロイノソースを得、続いてエステル化したのち還元と加水分解を行って、シロイノシトールを得る方法 (特許文献3 参照) 等がある。

【0010】

しかしながら、これら既知のシロイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で実施する方法としては、操作の煩雑さ、あるいは経済性の面で問題があるので、有機合成的手法によるシロイノシトールの製造方法は全て必ずしも満足し得るものではない。

【0011】

また、別の製造方法として微生物による培養変換と、化学還元反応を利用することにより、製造する方法が知られている。この方法は、微生物のミオーイノシトール代謝経路に存在するシロイノソースを作る能力（ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの作用による）を生かして、安価なミオーイノシトールから、一旦シロイノソースを得て、これを NaBH_4 のような化学的な還元剤を用いて還元し、生じるシロイノシトールを得る方法である。微生物は、上記のようなミオーイノシトール代謝経路を有するが、シロイノソースは通常、さらに代謝されるため、一般の微生物はシロイノソースを蓄積する能力を殆ど持たない。これまでに、シロイノソースを蓄積する能力を有する菌としては、シェードモナス属細菌、アセトバクター属細菌、グルコノバクター属細菌が知られている（特許文献4参照、特許文献5参照、特許文献6参照、非特許文献5参照、非特許文献6参照）。

【0012】

しかしながら、微生物を用いて、シロイノソースを得る方法は、続く化学還元方法とセットで、シロイノシトールの製造を行なっているため、工程の切り替えと高価な化学還元剤が必要であること、また、還元選択性が低く、還元された半分以上がミオーイノシトールへ戻るため、収率が低くなるといった問題点があった。

【0013】

また、ミオーイノシトールから直接にシロイノシトールへ変換する能力のある微生物も知られている。例えばアグロバクテリウム属に属する菌（特許文献7参照）、アセトバクター属に属する菌（特許文献8参照）。しかしながら、アグロバクテリウム属の細菌では、シロイノシトール以外に、異性体であるD-キローイノシトールも製造され、さらに、原料のミオーイノシトールの大半が残存し、シロイノシトールの収量も低いといった問題点がある。また、アセトバクター属の細菌では、シロイノシトール以外に、デハイドロキシ体であるシロークエルシトールも製造され、この物質がシロイノシトールと混晶を形成するため、精製工程であらかじめ誘導体を形成し、分別するという工程を踏まなければならない。

【0014】

一方、シロイノシトールデヒドロゲナーゼについて、ウシの脳中と、ゴキブリ脂肪組織中に存在するという報告例（非特許文献9参照）があり、この酵素はシロイノソースを基質として、NADPHで還元させると、シロイノシトールと、ミオーイノシトールの両方が生じるとされている。しかしながら、基質特異性が低い点、また、高度な精製酵素を必要とせず、諸性質も不明であることから、基質特異性の低いアルコールデヒドロゲナーゼである可能性があり、酵素ハンドブック（朝倉書店発行）には記載されなかった経緯を持つ。このように動物において報告例はあるものの、その真偽はさだかではない。

【特許文献1】米国特許第5,412,080号公報

【特許文献2】ドイツ連邦共和国特許 第3,642,999号公報

【特許文献3】ドイツ連邦共和国特許 第3,405,663号公報

【特許文献4】特開平2003-102492号公報

【特許文献5】特願平15-353490号

【特許文献6】特願平15-353491号

【特許文献7】特開平09-140388号公報

【特許文献8】特願平16-18128号

【非特許文献1】「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(アメリカ)、275巻 (No.24)、p.18495 - 18502 (2000年)

【非特許文献2】「ジャーナル オブ ザ アメリカン ケミカル ソサエティ (Jo

urnal of the American Chemical Society)」（アメリカ）、70巻p. 2931~2935 (1948年)

【非特許文献3】「ジャーナル オブ ザ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society)」（アメリカ）、90巻、p. 3289-3290 (1968年)

【非特許文献4】「アンジェワンド ケミー (Angewandte Chemie)」（ドイツ）、85巻、p. 1110-1111 (1973年)

【非特許文献5】「ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」（アメリカ）、174巻、p. 173-188 (1948年)

【非特許文献6】「ヘルベティカ キミカ アクタ (Helvetica Chimica Acta)」（ドイツ）、第24巻、p. 1045-1058 (1941年)

【非特許文献7】「ジャーナル オブ オーガニック ケミストリー (Journal of Organic Chemistry)」（アメリカ）、第26巻、p. 912-918 (1961年)

【非特許文献8】「ジャーナル オブ オーガニック ケミストリー (Journal of Organic Chemistry)」（アメリカ）、第23巻、p. 329 (1958年)

【非特許文献9】「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ」（アメリカ）、第68巻、p. 1133 (1976年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明は、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼとそれをコードするDNAを提供すること、及び、当該酵素を利用し、安価なミオーイノシトールから、直接に酵素変換のみで、短時間、高収量でシロイノシトールを得る方法、すなわち、シロイノソースのような中間体の単離や、化学還元試薬を使用せずに、高純度のシロイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、ミオーイノシトールからシロイノソースを生成する能力を有する微生物を探す研究により、自然界より分離したアセトバクター属に属する細菌 (AB10253株) を発見し、この菌株を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18868の受託番号で寄託した。さらに、この菌株を利用し、ミオーイノシトールからシロイノソースを製造する方法、および、得られたシロイノソースを化学還元によりシロイノシトールを製造する方法を確立し、この製造方法を特許出願した (特開平2003-102492号公報)。

【0017】

その後、シロイノソースへの変換能力を上げる目的で、この菌株を変異により育種したところ、これら変異菌株の中に、ミオーイノシトールから一旦生成したシロイノソースを生物的に還元を行ない、わずかにシロイノシトールを生成する菌株が存在することを発見した。そこで、この菌株を育種し、培養変換のみで、ミオーイノシトールから、直接にシロイノシトールを主要に生成、および蓄積させることを目的に、さらに変異育種を行なったところ、目的に合致する変異菌株を得ることに成功し、この変異菌株を当該生物寄託センターにFERM P-19639の受託番号で寄託した後、この製造方法を特許出願した (特願平16-18128号)。

【0018】

次に、本菌株の菌体中でどのような形式で、ミオーイノシトールからシロイノシトールへ変換がなされているか検討したところ、ミオーイノシトールの2位の水酸基が、酸素依存で酸化され、シロイノソースになった後に、NADHまたはNADPH依存でシロイノソースをシロイノシトールへ還元する活性を有する酵素が働き、シロイノシトールが生

成することを見出し、そのような働きをする還元酵素を精製することに成功した。

【0019】

さらに、この研究過程で使用した酵素活性測定方法を他の菌に応用したところ、数種の菌で、弱い活性が見出された。この中には、全塩基配列が決定されている大腸菌が含まれ、大腸菌から、その酵素を精製することに成功した。

【0020】

次に、大腸菌から得られたその酵素のN末端アミノ酸配列解析から、この酵素の全アミノ酸配列および塩基配列を推定し、大腸菌ゲノムからPCR法による遺伝子の単離、発現を行ない、この酵素がNADPH依存で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する活性と、NADP⁺依存で、シロイノシトールをシロイノソースへ酸化する活性を有することを見出し、この酵素を「シロイノシトールデヒドロゲナーゼ」と命名した。また、本酵素はミオイノシトールの5位の水酸基も酸化する能力を有していることから、ミオイノシトール5-デヒドロゲナーゼと称することもできる。

【0021】

さらに、大腸菌のシロイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列に相同性のある酵素を検索し、アグロバクテリウム属、バチルス、ズブチリス、キサントモナス、キャンペストリスのゲノムからPCR法による遺伝子の単離、発現を行ない、そのようにして検索された酵素がNADHまたはNADPH依存でシロイノソースをシロイノシトールへ還元する活性を有することを見出した。

【0022】

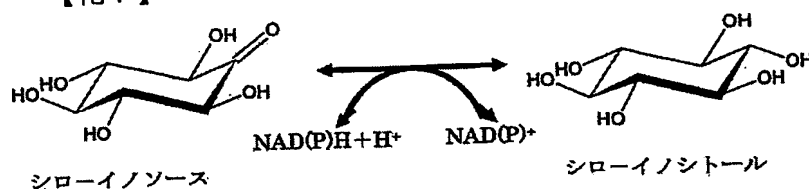
また、本研究者は、本酵素がNADまたはNADP依存で、酸化還元反応を行なうことから、既存のミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ（NADまたはNADP依存で、シロイノソースをミオイノシトールへ還元する活性を有する：EC 1.1.1.18）と共役させることによって（図1：参照）、安価なミオイノシトールからシロイノソースを経由して、シロイノシトールへ直接変換できると考え、これに成功した。

【0023】

従って、本発明は以下の通りである。なお、%で示した値は質量/体積（W/V）の百分率を示すものであり、濃度を%で表示する場合は、以下においても同様とする。

(1)： 下記の理化学的性質を有するシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。
反応：化7に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

【化7】



【0024】

(2)： さらに、下記の理化学的性質を有する、(1)に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

- (i) 分子量および会合特性： 38~46 k ダルトン、2または3 量体を形成する。
- (ii) 補酵素： NAD⁺若しくはNADP⁺又はNADH若しくはNADPHを補酵素とする。
- (iii) 活性化重金属： Co²⁺イオンの存在下で活性化される。
- (iv) 阻害重金属： Sn²⁺イオンの存在下で阻害される。
- (v) 至適 pH： pH 5 ~ 9 で活性を有する。

【0025】

(3)： 以下の (a) または (b) のタンパク質。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【0026】

(4) : 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【0027】

(5) : 以下の(a)または(b)のDNA。

(a) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0028】

(6) : (4)または(5)のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

【0029】

(7) : (4)または(5)のいずれかに記載のDNA、または(6)に記載のベクターを保持する形質転換微生物。

【0030】

(8) : 形質転換する宿主が大腸菌である(7)に記載の形質転換微生物。

【0031】

(9) : (7)または(8)のいずれかに記載の形質転換微生物を培養し、培養物から(1)に記載の酵素を採取することを特徴とする、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

【0032】

(10) : (1)に記載のシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼと、 NAD^+ または NADP^+ 存在下でミオ-イノシトールを酸化しシロ-イノソースを生成する反応を触媒するミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ(EC 1. 1. 1. 18)とを共存させた溶液中で、pH6.0~8.5で、 NAD^+ または NADP^+ 存在下で、ミオ-イノシトールを基質として、シロ-イノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする、シロ-イノシトールの製造方法。

【0033】

(11) : (10)に記載の溶液中に、シロ-イノソースを0.01~3%になるように添加することを特徴とする、(10)に記載のシロ-イノシトールの製造方法。

【0034】

(12) : (10)に記載の溶液中に、シロ-イノソースを0.2~0.5%になるように添加することを特徴とする、(10)に記載のシロ-イノシトールの製造方法。

【0035】

(13): (10)に記載の溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.01~5.0mMになるように添加することを特徴とする、(10)に記載のシロイノシトールの製造方法。

【0036】

(14): (10)に記載の溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.2~2.0mMになるように添加することを特徴とする、(10)に記載のシロイノシトールの製造方法。

【0037】

(15): (10)に記載の溶液中のミオイノシトール濃度が5~22%になるように調製し、酵素反応で生成したシロイノシトールを反応溶液中で結晶化させ、シロイノシトールを系外に結晶として、ろ別することを特徴とする、(10)に記載のシロイノシトールの製造方法。

【発明の効果】

【0038】

本発明によれば、医薬品として利用価値があるシロイノシトールを、安価なミオイノシトールから、酵素反応のみで、直接に製造することができ、シロイノシトールを短時間、高純度で収率良く、製造することができる。また、本発明酵素を用いたシロイノシトール製造方法は酵素変換であるため異性体が生じない。さらにミオイノシトールの酸化反応には酸素を要求しない特徴を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

本発明の新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼ（以下、本発明酵素ともいう）、タンパク質（以下、本発明タンパク質ともいう）、当該シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNA（以下、本発明DNAともいう）、同DNAを含有するベクター（以下、本発明ベクターともいう）、同DNAもしくは同ベクターを保持する形質転換微生物（以下、本発明形質転換微生物ともいう）、当該形質転換微生物の製造方法、新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法（以下、本発明酵素の製造方法ともいう）、およびこれを利用したシロイノシトールの製造方法について以下詳細に説明する。

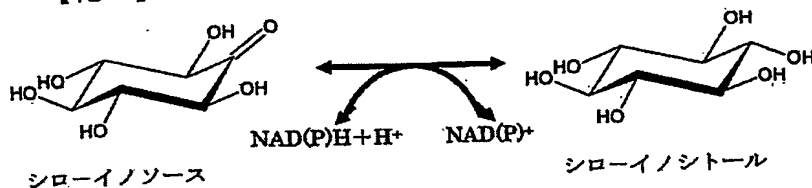
【0040】

本発明酵素、本発明タンパク質、本発明DNA

<本発明酵素>

本発明酵素は、化8に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

【化8】



本発明酵素は上記反応活性を有するものである限り、その由来は限定されるものではないが、微生物由来であることが好ましく、大腸菌 (*Escherichia coli*)、アセトバクター属 (*Acetobacter*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*) 等であることが特に好ましい。更に、大腸菌 K-12 株 ATCC10798 (*Escherichia coli* K-12 ATCC10798)、アセトバクター・エスピー AB10281 株 FERM P-18868 (*Acetobacter* sp. AB10281 FERM P-18868)、バチルス ズブチリス 168 株 ATCC23857 (*Bacillus subtilis* 168 ATCC2

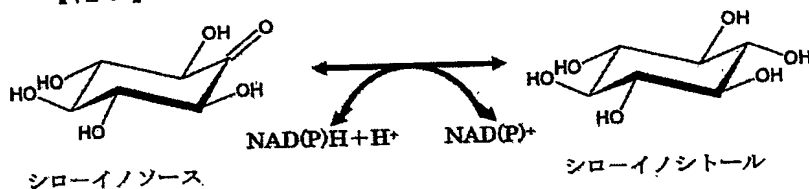
3857)、アグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970 (Agrobacterium tumefaciens C58 ATCC33970)、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383 (Agrobacterium sp. AB10121 FERM P-17383)、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス ATCC33913 (Xanthomonas campestris pv. campestris ATCC 33913)であることが特に好ましい。

【0041】

本発明酵素は、下記の理化学的性質を有するシロイノシトールデヒドロゲナーゼが含まれる。

反応：化9に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

【化9】



シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の測定方法は、還元活性を測定する方法と、酸化活性を測定する方法、いずれの測定方法でも、測定可能であるが、酸化活性の測定は共存するミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼに由来する活性により、精度が低く、また、酸化活性自体が微弱なため、好ましくは、還元活性を測定する方が望ましい。

還元活性の測定は、シロイノソースを基質にして、NADHまたは、NADPHを共存させ、NADHまたはNADPHの340nmの吸収の減少を測定することで成される。また、反応後の溶液を、HPLC、GLCなどの分析装置で、生産物（シロイノシトールか、ミオイノシトール）の判断でも可能である。

【0042】

本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

分子量および会合特性： 38~46kダルトン、2または3量体を形成する。

分子量は、SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動）などの結果から、またはDNAの全長から酵素の推定分子量を算出することができる。また、会合特性は、ゲルろ過カラム（東ソー社：2000SWXL）で分画した画分の活性を測定し、相当する分子量画分から、分子量を計算し、これを、酵素の分子量で割った値を整数化することにより求めることが可能である。

【0043】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

補酵素： NAD^+ 若しくは NADP^+ 又は NADH 若しくは NADPH を補酵素とする。

補酵素の選択性は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPHまたはNADH、1%シロイノソース）5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認することができる。なお、%で示した値は質量/体積（W/V）の百分率を示すものであり、濃度を%で表示する場合は、以下においても同様とする。

【0044】

また、上記測定法により補酵素相対活性も確認することが可能である。当該補酵素相対活性により、例えば、NADPH：NADHが100：1~100：10のグループ、100：10~100：30のグループ、100：30~100：60のグループ、100：60

～100:120のグループに分けることも可能である。

【0045】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

活性化重金属 : Co^{2+} イオンの存在下で活性化される。または、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} イオンの存在下で活性化される場合もあり得る。

阻害重金属 : Sn^{2+} イオンの存在下で阻害される。または、 Zn^{2+} イオンの存在下で阻害される場合もあり得る。

当該重金属による効果は、反応液 (200mM トリス緩衝液 pH8.0、2% NADPH、1% シロイノソース、2mM 金属塩) 5 μ l と、酵素液 5 μ l を混合し、36℃、30min 反応後、ただちに、500 μ l の水を加えて、340nm の吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nm の吸光度の減少量を測定することで確認できる。「活性化されるとは」重金属無添加区の酵素活性を100%としたときに重金属 1mM 添加区の酵素活性が105%以上を、好ましくは120%以上を示すことを意味する。一方、「阻害されるとは」重金属無添加区の酵素活性を100%としたときに重金属 1mM 添加区の酵素活性が95%以下に、好ましくは70%以下になることを意味する。

【0046】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

至適 pH : 本発明酵素は、pH5～9 で活性を有する。

至適 pH は、反応液 (200mM リン酸緩衝液 pH5.0～9.0、2% NADPH、1% シロイノソース) 5 μ l と、酵素液 5 μ l を混合し、36℃、30min 反応後、ただちに、500 μ l の水を加えて、340nm の吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nm の吸光度の減少量を測定することで確認できる。至適 pH とは、最大活性の90%以上の活性を有することを意味する。本発明酵素は、例えば、至適 pH の範囲により酸性側に至適 pH があるグループ (至適 pH が pH5.5～6.5)、中性域に至適 pH があるグループ (至適 pH が pH6.5～7.5 または pH6.5～8.5)、アルカリ性側に至適 pH があるグループ (至適 pH が pH7.0～8.5 または pH7.5～9.0) に分けることも可能である。

【0047】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

熱安定性: 本発明酵素は、60℃まで安定である。

熱安定性は、酵素液を所定の温度で10min間処理した後、冷却し、この酵素液と反応液 (200mM リン酸緩衝液 pH5.0～9.0、2% NADPH、1% シロイノソース) 5 μ l を混合し、36℃、30min 反応後、ただちに、500 μ l の水を加えて、340nm の吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nm の吸光度の減少量を測定することで確認できる。「熱安定であるとは」20℃10min処理区の活性を100%として、上記熱処理した酵素の活性が90%以上残存していることを意味する。

【0048】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

シロイノソースに対する K_m 値: シロイノソースに対する K_m 値は、2～13mM を示す。

シロイノソースに対する K_m 値は、反応液 (200mM トリス緩衝液 pH8.0、2% NADPH、0.001～2.5% シロイノソース) 5 μ l と、酵素液 5 μ l を混合し、36℃、30min 反応後、ただちに、500 μ l の水を加えて、340nm の吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nm の吸光度の減少量を測定することで確認できる。測定値は定法に従い、逆数プロットし、 K_m 値を算出する。本発明酵素は、例えば、シロイノソースに対する K_m 値が4mM未満のグループ、4mM以上10mM未満のグループ、10mM以上13mM未満のグループに分けることも可能である。

【0049】

また、本発明酵素は、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

基質特異性: 相対活性が70%以上の基質は、シロイノシトール (SI)、ミオイノ

シトール (MI)、D-キローイノシトール (DCI)、エピーイノシトール (EI)、L-キローイノシトール (LCI) が挙げられる。相対活性が20%以上70%未満の基質は、L-キローイノシトール (LCI)、エピーイノシトール (EI)、ムコーイノシトール (MuI)、ミオーイノシトール (MI)、D-キローイノシトール (DCI)、アローイノシトール (AI)、ネオーイノシトール (NI) が挙げられる。相対活性が20%未満の基質は、アローイノシトール (AI)、ネオーイノシトール (NI)、D-キローイノシトール (DCI)、L-キローイノシトール (LCI)、エピーイノシトール (EI)、ムコーイノシトール (MuI) が挙げられる。

基質特異性は、酸化活性を指標にシローイノシトールに対する反応性に対する相対活性を測定することで確認できる。イノシトール異性体としては、シローイノシトール (SI)、ミオーイノシトール (MI)、D-キローイノシトール (DCI)、L-キローイノシトール (LCI)、エピーイノシトール (EI)、ムコーイノシトール (MuI)、アローイノシトール (AI)、ネオーイノシトール (NI) 等が挙げられる。本発明酵素の基質特異性は、相対活性が70%以上の区、70%未満20%以上の区、20%未満の区に分けて示すことが可能である。

測定方法として、反応液 (各種イノシトール異性体1% (ネオーイノシトールのみ0.4%))、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002%NADP⁺、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー) 50 μ lと、酵素液50 μ lを混合し、25 $^{\circ}$ C、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定することが可能である。

【0050】

これら理化学的性質は、そのいずれかの組み合わせを有していることが望ましい。

【0051】

<本発明酵素の製造および精製>

本発明酵素の製造に使用することのできる微生物としては、本発明酵素生産能を有する限り特に限定されないが、例えば、大腸菌K-12株 ATCC10798 (*Escherichia coli* K-12 ATCC10798) (以下、大腸菌K-12株ともいう)、アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM P-18868 (*Acetobacter* sp. AB10281 FERM P-18868) (以下、AB10281株ともいう)、バチルス ズブチリス 168株 ATCC23857 (*Bacillus subtilis* 168 ATCC23857) (以下、*Bacillus* sub. 168株、*B. sub.* 168株ともいう)、アグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970 (*Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970) (以下、*A. tume.* C58株ともいう)、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383 (*Agrobacterium* sp. AB10121 FERM P-17383) (以下、AB10121株ともいう)、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス ATCC33913 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913) (以下、*X. camp.* ともいう) が挙げられる。

本発明酵素を製造する目的で、これら微生物を培養するために用いる培地は、従来知られる一般的な微生物用培地を使用することが可能である。例えば、アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM P-18868、バチルス ズブチリス 168株 ATCC23857、アグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス ATCC33913を培養するときの培地組成は、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、シローイノシトールへの変換原料であるミオーイノシトールに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含む培地であればよく、合成培地・天然培地のいずれも使用できる。ミオーイノシトールを0.1~40%、より好ましくは10~30%添加し、炭素源としては、グリセロール、シュクロース、マルトースあるいは澱粉を0.1~20%、より好ましくは0.3~5

%, 窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01~5.0%、好ましくは0.5~2.0%添加するのが望ましい。その他、必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することができる。培養液中の水素イオン濃度は特に調整する必要は無いが、好ましくはpH4~10、より好ましくはpH5~9に調整し培養すると、効率よくシロイノシトールデヒドロゲナーゼ含有する菌体を得ることができる。

【0052】

培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は12~38℃、好ましくは20~27℃であり、また、培養は液体培地を振とうするか、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行えば良い。培養期間は、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが最大または、必要量の活性量を示すまで行えば良く、通常1~10日、好ましくは3~8日である。

【0053】

一方、大腸菌K-12株 ATCC10798を培養する時の培地の組成も、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよく、合成培地・天然培地のいずれも使用できる。例えば、LB培地や、TB培地の他、YT培地などが例示される。さらに、大腸菌K-12株 ATCC10798のシロイノシトールデヒドロゲナーゼの比活性を約3倍増加させる物質として、培地にソルボースを0.05~1%、好ましくは0.5%添加するのが望ましい。培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は28~38℃、好ましくは36℃であり、また、培養は液体培地を振とうするか、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行えば良い。培養期間は、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが最大または、必要量の活性量を示すまで行えば良く、通常1~3日、好ましくは1日である。

【0054】

この様に培養した菌体から酵素を分離精製することにより本発明酵素を得ることができる。酵素の分離精製は、通常のタンパク質精製方法と同様にして行うことができる。以下具体的に説明するが、分離精製方法はこれらに限定されない。

【0055】

まず、培養後に得られた菌体を集めるためには、遠心分離や、膜濃縮などの方法が使用できる。必要であれば、この段階で、菌体を適当な溶液に懸濁し、再度、遠心分離や、膜濃縮などの方法で、菌体を集めることで洗浄することができる。このようにして得られた菌体は、次に、オートミールや、超音波などの物理的方法で破碎し、菌体内に存在する本発明酵素を抽出することが可能である。

【0056】

破碎された菌体を含む菌体破碎液は、遠心分離や、膜濃縮などの方法で、可溶物と、不溶物に分けられる。その後、可溶物から当該酵素を単離するために、一般的な酵素精製の手順に則って、精製することができる。すなわち、ブルートヨパール（東ソー社）などのアフィニティーカラム、DEAEカラム、CMカラムに代表されるイオン交換カラム、ゲルろ過カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、などのカラム操作の他、硫酸分画法、等電点沈殿法などのバッチワイズな操作法も使用できる。

【0057】

本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の測定方法は、還元活性を測定する方法と、酸化活性を測定する方法、いずれの測定方法でも、測定可能であるが、酸化活性の測定は共存するミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼに由来する活性により、精度が低く、また、酸化活性自体が微弱なため、好ましくは、還元活性を測定の方が望ましい。還元活性の測定は、シロイノソースを基質にして、NADHまたは、NADPHを共存させ、NADHまたはNADPHの340nmの吸収の減少を測定することで成される。また、反応後の溶液を、HPLC、GLCなどの分析装置で、生産物（シロイノシトールか、ミオイノシトール

) の判断も可能である。

【0058】

精製された酵素は、その精製度をNative (ネイティブ) PAGEや、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) PAGEなどを用いた電気泳動によって、確認することができる他、P V D F膜などのタンパク吸着性膜へ、トランスブロットすることにより、相当するタンパク質をより高度に精製することができる。

【0059】

<本発明タンパク質>

本発明タンパク質は、以下の (a) または (b) のタンパク質である。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【0060】

上記「1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質」とは、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を実質的に害さない1もしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および/または付加を有していてもよいことを示す。

【0061】

すなわち、天然に存在するタンパク質には、それをコードするDNAの多形や変異の他、生成後のタンパク質の細胞内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入、および/または付加等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、本発明タンパク質に包含される。人為的にタンパク質の配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。また、ある種のタンパク質は、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型タンパク質への転換に際して除去される。このようなタンパク質は、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するタンパク質であり、本発明タンパク質に包含されるものである。

【0062】

なお本明細書における「複数のアミノ酸」とは、本発明酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば400アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、1～20程度、好ましくは1～10、より好ましくは1～3の数を示す。また、本発明タンパク質との相同性が、80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上となる程度の数値を示すタンパク質は本発明タンパク質に含まれる。

【0063】

<本発明DNA>

本発明DNAは、前記本発明タンパク質をコードするDNAである。同DNAとしては具体的には、以下の (a) または (b) のタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、前記タンパク質をコードしているのであればその塩基配列は特に限定されない。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

【0064】

すなわち、配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列は、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を実質的に害さない1もしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および/または付加を有していてもよく、そのようなアミノ酸配列の置換、欠失、挿入、および/または付加を有するタンパク質をコードする、塩基配列の置換、欠失、挿入、および/または付加を有するDNAのいずれもが本発明DNAに包含される。なお本明細書における「複数のアミノ酸」とは、本発明酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば400アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、1~20程度、好ましくは1~10、より好ましくは1~3の数を示す。当業者であれば、本発明酵素の活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および/または付加を容易に選択することができる。DNAの塩基配列の置換、欠失、挿入、および/または付加は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987)) などの方法によっても、DNAに置換、欠失、挿入、および/または付加を導入することができる。

【0065】

また、本発明DNAは、以下の(a)または(b)のDNAである。

(a) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0066】

ここでいう「ストリジェントな条件下」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリジェントな条件下」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100μg/mlサケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1% SDS溶液、50℃下で0.1×SSC、0.1% SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。、別の言い方をすれば、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAが特異的にハイブリダイズする条件が挙げられる。すなわち、本発明DNAとの相同性が、80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上を示すDNAは本発明DNAに含まれる。

【0067】

<本発明DNAの検索、単離およびその発現>

本発明DNAは、例えば、上述により製造、精製された本発明酵素を、PVDF膜へトラ

ンスプロットし、N末端アミノ酸分析装置 (Hewlett Packard社) によって、アミノ酸を解析し、明らかとなったアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAを遺伝子データベース (データベース名: 「GenBank」) から検索することが可能である。

【0068】

本発明DNAは、例えば、微生物から抽出した全ゲノムを鋳型にして、前記検索により見いだされた本発明DNAを含む領域をカバーするプライマーを合成し、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を実施することにより単離できる。

また、本発明DNAは、その相同性から推定されるホモログDNAを単離することによっても得ることが可能である。たとえば、本発明DNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列から三次元構造および機能などを推定し、本発明DNAによりコードされるタンパク質に相同なタンパク質をコードするDNAを有する微生物を検索することにより様々な由来の本発明DNAの単離が可能である。ここで、ydgJ遺伝子と称される一連の相同性の高い遺伝子は、本発明DNAである可能性が高い。

【0069】

このようにして得たDNAをプラスミドベクターに組み込むため、あらかじめ断片の末端に、適切な制限酵素サイトを設定しておき、これをプラスミドベクター上にある同じ制限酵素サイトへ、挿入後、ライゲートさせることによって、プラスミドを構築できる。この際に使用するプラスミドは、好ましくは、マルチクローニングサイトを有する発現プラスミドベクターが使用されるが、酵素を発現させることが可能であり、かつ、適当な制限酵素サイトを有する他のプラスミドベクターであっても使用できる。

また、プラスミドに組み込まれたDNAを発現させるために使用されるプロモーターは、宿主微生物中で、DNAが発現すれば、特に限定されない。例えばlacプロモーター、tacプロモーターなどが使用できる。

【0070】

このように調製された組換えプラスミドベクターは、宿主微生物に導入することが可能である。この際用いられる宿主微生物としては、組換えプラスミドベクターが、安定でかつ自律的に増殖可能であるものであれば特に制限されず、通常の遺伝子組換えに用いられているもの、例えばエッシャーヒア属、バチルス属に属する微生物などが好ましく使用され、更に好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) が使用できる。

【0071】

宿主微生物に組換えプラスミドベクターを導入する方法としては、例えば宿主微生物がエッシャーヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で、組換えDNAの導入を行ってもよいし、コンピテントセル法を用いてもよい、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法またはマイクロインジェクション法を用いることが可能である。宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、組換えプラスミドベクターを構成するベクターの薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で、当該宿主微生物を培養し、生育する宿主微生物を選択すればよい。

【0072】

次に、酵素を発現誘導するために使用される培地は、宿主微生物が安定して増殖する培地であれば、特に限定されない。例えば、Nutrient Broth、L-Broth、などを例示することができる。また、プラスミドベクターの種類によっては、培地中にDNAを発現させるためにイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) のようなインデューサーを加えてもよいし、培養途中にインデューサーを加えても良い。

【0073】

このように調製されたDNAをもつ組換えプラスミドベクターを導入した宿主微生物を培養し、本発明DNAを発現させる。発現した本発明酵素を有する微生物は、遠心分離され、培地を除去し、さらに、ペレットとなった微生物を水で洗浄後、遠心分離し、洗浄菌体を得ることができる。この洗浄菌体を水、または適当な溶液に懸濁させ、超音波によって菌を破碎する。破碎後、遠心分離し、上清の本発明DNA由来のリコンビナント酵素を

含有する溶液を得る事ができる。

【0074】

＜本発明酵素を用いたシロイノシトールの製造方法＞

上述した本願発明酵素は、シロイノソースにNADHまたはNADPHが作用して、還元し、シロイノシトールを生成する反応を触媒する。一方、既存のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、 NAD^+ または NADP^+ 存在下で、ミオーイノシトールを酸化し、シロイノソースを生成する反応を触媒する。

【0075】

本発明酵素を用いたシロイノシトールの製造方法は、本願発明酵素と、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼとを共存させた溶液中で、NADHまたはNADPH存在下で、(図1を参照)、安価なミオーイノシトールを基質として、シロイノソースを経由して、シロイノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする製造方法である。

【0076】

本製造方法で使用する本発明酵素は、上述した酵素の精製によって製造した酵素であってもよく、遺伝子操作によって発現させたリコンビナント酵素でもよい。リコンビナント酵素を発現した菌体は、洗浄後に、そのまま反応溶液に加えて、菌体懸濁液として反応させることもできるが、好ましくは、菌体を破碎し、菌体内に存在する酵素を抽出した溶液を用いることが好ましい。また、この抽出液を精製して使用することもできる。精製としては硫安分画処理、または、イオン交換樹脂に吸着後、塩濃度による直線濃度勾配を利用したカラムクロマトグラフィー、温度処理などによって、精製することができる。さらに、本酵素は固定化酵素もしくは固定化菌体としても使用可能である。固定化法としては、ゲル抱埋法、イオン交換樹脂吸着法など、一般の固定化方法が適用できる。

【0077】

この製造方法で使用する既知のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、市販の酵素でも良く、また、バチルス ズブチリスや、バチルス ハロデュランスの培養菌体からミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを精製によって製造した酵素であってもよく、遺伝子配列が既知であることから、遺伝子操作によって発現させたリコンビナント酵素でもよい。リコンビナント酵素を発現した菌体は、洗浄後に、そのまま反応溶液に加えて、菌体懸濁液として反応させることもできるが、好ましくは、菌体を破碎し、菌体内に存在する酵素を抽出した溶液を用いることが好ましい。また、本抽出液を精製して使用することもできる。精製としては硫安分画処理、または、イオン交換樹脂に吸着後、塩濃度による直線濃度勾配を利用したカラムクロマトグラフィー、温度処理などによって、精製することができる。さらに、本酵素は固定化酵素もしくは固定化菌体としても使用可能である。固定化法としては、ゲル抱埋法、イオン交換樹脂吸着法など、一般の固定化方法が適用できる。

【0078】

リコンビナント酵素を使用する場合、遺伝子操作により、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼと、本発明酵素を両方同時に発現させることも可能であり、そのようにして発現し調製された酵素液等を使用することもできる。

【0079】

本反応系でのミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼと、シロイノシトールデヒドロゲナーゼの活性量(U)の比率は、ユニット数で定義すると、36℃において、基質をシロイノソースとした時、1min間に $1\mu\text{mol}$ のNADHまたはNADPHが消費されるのを1Uとした場合、両方の活性量(U)の比率が、1:10~10:1、好ましくは1:2~2:1になるようにするのが望ましい。

【0080】

本反応系では、補酵素 NAD^+ または NADP^+ が必要であり、反応液中でNADHまたはNADPHに変換され、且つ、NADHまたはNADPHは NAD^+ または NADP^+ に戻るため、リサイクルされることがわかる。 NAD^+ または NADP^+ とNADHまたはNADPHは、溶液中のpH安定性が異なり、 NAD^+ または NADP^+ はpH8.0以下で安定であり、NADHまたはNADPHはpH8.0以上で安定である。

従って、本反応系のpHは約 pH8.0に保つことが好ましい。

【0081】

本酵素反応に使用する補酵素は、 NAD^+ 、 NADH 、 NADP^+ 、 NADPH の何れか1つ又は、これらの混合物としても利用することができるが、安定性を考慮すると、 NAD^+ または、 NADP^+ が望ましく、その濃度は、0.0001~0.1%、好ましくは0.004~0.01%添加することが望ましい。

【0082】

加えて、本反応系の中間体であるシロイノソースを反応溶液に添加することにより、本反応の反応速度は著しく増大する。従って、シロイノソースを0.01~3%、好ましくは0.2~0.5%になるように反応溶液に添加するのが望ましい。

【0083】

また、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼと本発明酵素は、pH8.0において反応させることができるため、酵素反応の溶液のpHは、pH6.0~8.5の範囲に調整して反応させるが、 NAD^+ または NADP^+ の安定性、シロイノソースの安定性を考慮して、好ましくはpH7.7~8.3、さらに好ましくは、pH8.0が望ましい。また、反応中に、このpHを反応中に保つために、必要があれば、緩衝液を加えることもできる。加える緩衝液の種類は特に限定されないが、pH8.0付近で緩衝能力のある緩衝液が望ましく、さらに好ましくは、リン酸緩衝液、トリス緩衝液などが例示される。

【0084】

さらに、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、 Mg^{2+} イオンで活性化され、シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、 Co^{2+} イオンで活性化されることから、これらの金属イオンを添加することで、反応速度は増大する。従って、Co塩および/または、Mg塩を0.01~5.0mM、好ましくは0.2~2.0mMになるように反応溶液に添加するのが望ましい。使用されるCo塩、Mg塩は水に溶解する塩であれば使用することができ、塩酸塩、硫酸塩などが例示される。

【0085】

本発明に使用する基質であるミオイノシトールの反応溶液中の濃度は1~30%、好ましくは5~22%で使用するの望ましい。反応が進行すると、1.6%を超える過飽和のシロイノシトールは結晶として析出するため、ミオイノシトールは減少する。そのため、減少したミオイノシトール量を反応溶液に添加して、ミオイノシトール濃度を一定に維持し、反応を連続的行なうこともできる。

【0086】

本発明の反応温度は、反応が進行すれば、特に限定されないが、基質の溶解度、 NAD^+ または NADP^+ の安定性、酵素の耐熱性を考慮すると、20~50℃、好ましくは35~40℃で反応させることが望ましい。菌体を懸濁する方法であれば、不均一反応の為に、攪拌を必要とするが、抽出酵素を使用する場合は、均一溶液なので、攪拌する必要は無いが、温度を均一化するため攪拌することが望ましい。

【0087】

本発明の酵素反応は反応物であるシロイノシトールが溶解度以上になれば、結晶性シロイノシトールとして沈殿させることができるため、ろ過、デカンテーション等の固液分離を用いれば、反応を停止させる必要は無く、ろ過液などの溶液に再度ミオイノシトールを添加して反応を続けることができる。

【0088】

本発明の酵素反応の停止が必要な場合は、酵素反応自体が停止すればよく、加熱、pHの変化、タンパク質変性剤の添加などの方法が使用できる。しかしながら、次工程のシロイノシトールの精製を考慮すると、加熱が望ましい。例えば、反応溶液を70~120℃、好ましくは80~90℃で10~20分間加熱するなどが例示できる。

【0089】

また、本発明の酵素反応の停止は、酵素を回収して、反応を停止させることもできる。酵素回収はイオン交換樹脂カラムに反応溶液を通過させることにより酵素を回収すること

ができる。固定化された酵素を使用した場合は、反応溶液を遠心分離、あるいはろ過操作することによって、固定化酵素を回収することができる。

【0090】

反応停止後、または反応中に過飽和になったシロイノシトールは結晶として析出する。結晶性シロイノシトールは、ろ別、または遠心分離などの操作で単離することができる。さらに、菌体、不溶性変成タンパクと共存する場合は、水を加えて結晶性シロイノシトールを溶解後に、ろ別、または遠心分離などの操作を加えることで、菌体、不溶性変成タンパクを除去することができる。

【0091】

このようにして得られた結晶性シロイノシトールの精製方法は以下の様に行なうことができる。この段階で留意する点は、結晶性シロイノシトール中に含まれる、ネオイノシトールの除去である。ネオイノシトールは、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが、一部のミオイノシトールの5位を酸化することによって生じるネオイノソースが、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼによって、還元されて生じた物質で、本反応系で微量に生じる物質である。また、ネオイノシトールは、水溶解度が0.5%と、低く、シロイノシトールと共に結晶性の沈殿を起ししやすい物質である。

【0092】

しかし、この結晶性シロイノシトールを再度水に溶解して得られるシロイノシトール溶液は、ミオイノシトールを殆ど含んでおらず、再濃縮した時に生じる結晶性シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離する操作で、微量のネオイノシトールを含有するシロイノシトールを得る事ができる。また、より高度に精製する場合、脱塩カラム、活性炭カラムを通過させて、精製後、液体を濃縮することで、再び結晶化してくる再結晶シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離することで、ネオイノシトールを含まない純品シロイノシトールを得る事ができる。

【0093】

脱塩カラムは、イオン交換樹脂を用いたカラムが望ましい。この際に使用されるイオン交換樹脂は、強塩基性イオン交換樹脂、および、弱塩基性イオン交換樹脂の何れか1つ、もしくは、両方の混合物と、強酸性イオン交換樹脂、及び弱酸性イオン交換樹脂の何れか1つ、もしくは、両方の混合物が使用できる。イオン交換樹脂の作用のさせ方は、カラム状に詰めたイオン交換樹脂中に溶液を通す方法が最適であるが、バッチ式で攪拌混合し、ろ過することで脱塩することも可能である。

【0094】

活性炭カラムは、脱色を目的とし、溶液をカラム状に詰めた活性炭中に溶液を通す方法も使用できるが、バッチ式で攪拌混合し、ろ過することで脱色することも可能である。

【0095】

次に、酵素反応停止後、反応溶液中に溶解している溶解性シロイノシトールの精製方法は以下の様に行なうことができる。この段階で留意する点は、結晶性シロイノシトールと異なり、ミオイノシトール、とネオイノシトールの除去である。

【0096】

溶解性シロイノシトールは、原料のミオイノシトール、およびネオイノシトールと一緒に溶解しており、ろ別、または遠心分離などの操作で溶液として、取り出すことができる。これらの溶液は、他に、溶解性ペプチド、塩を含んでいるため、脱塩カラム、活性炭カラムを通過させて、精製後、ミオイノシトールが析出しない程度（ミオイノシトールが21%以上にならないよう）に濃縮し、析出してくる結晶性シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離することができる。必要があれば、水と混和する有機溶媒を加えて、結晶化させることも可能である。有機溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノールなどが挙げられる。

【0097】

以下、本発明を実施例により具体的に詳述するが、本発明はこれらに限定されない。なお、%で示した値は質量/体積 (W/V) の百分率を示すものであり、濃度を%で表示す

る場合は、以下においても同様とする。

【実施例 1】

【0098】

＜アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM P-18868の産生する本発明酵素の精製＞

ミオーイノシトール 10.0%、酵母エキス 1.0%、シュクロース1.0%を含む液体培地3リットルを、1N NaOHを用いて pH7.0に調製し、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコ30本に分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにアセトバクター・エスピー AB10281株 FERM P-18868のスラント培養物を1白金耳接種し、27℃で5日間ロータリーシェーカー（180 rpm）を用いて培養した。培養後、各々の三角フラスコに、水を250mlずつ加え、1時間ロータリーシェーカーで攪拌し、培養液に存在する結晶性のシロイノシトールを溶解した。この培養液を集めて、遠心分離（8,000 rpm 20分間）し、菌体（湿重量75 g）を得た。

【0099】

この菌体を300mlの水に懸濁し、10℃以下で超音波で破碎した。破碎溶液は、pH4.8を示し、この溶液を1NのNaOHでpH7.0に調製した後に、遠心分離（16,000 rpm 20分間）により、上清液を単離した。次に、上清液が2mM Mg^{2+} になるように $MgSO_4$ を加えて、ブルトヨパールカラム（東ソー社：20ml）にチャージし、2mM Mg^{2+} になるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、カラムを洗浄した。その後、1M KClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、吸着タンパクを溶出させた。次に、溶出液をMW30000cut offの限外ろ過装置で、濃縮を行ない、濃縮液に、20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを加えて、再度濃縮し、脱塩濃縮液を得た。次に、この脱塩濃縮液を、DEAEトヨパールカラム（東ソー社：20ml）にチャージし、20mMトリス緩衝液pH7.0 から、500mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、吸着しなかった画分（SIDH1）、200mM NaClで溶出した画分（SIDH2）、300mMで溶出した画分（SIDH3）の三つの画分にそれぞれ、活性があった。

【0100】

活性測定は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPH、1%シロイノソース）5μlと、酵素液5μlを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500μlの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

【0101】

上記カラム非吸着画分は、さらに、CMトヨパールカラム（東ソー社：20ml）にチャージし、20mMトリス緩衝液pH7.0 から、500mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、吸着しなかった画分に、活性があった。200mM NaClで溶出した画分、300mMで溶出した画分は、それぞれ別々に、再度限外ろ過装置で脱塩し、DEAEトヨパールカラム（東ソー社：20ml）にチャージし、200mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 から、300mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画し、精製した。さらに、これら三つのシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素液を、それぞれ、限外ろ過装置で濃縮し、ゲルろ過カラム（東ソー社：2000SWXL）にチャージし、溶出液に200mM NaClになるように添加した20mMリン酸緩衝液pH7.0を用いて、精製した。このように精製された酵素液をスラブゲルSDS電気泳動し、電気泳動後ゲルを取り出し、コマシプリリアントブルー染色液（ラピッドCB B KANTO：関東化学社製）で染色後脱色し、青く染まるタンパク質のバンドをデンシトメーター（ATTO社製）で測定し、目的のバンドの純度を測定したところ、いずれも純度85%以上であった。

【実施例 2】

【0102】

<大腸菌 K12 株 ATCC10798 が産生する本発明酵素の精製と、N 末端分析>
L-ソルボース 0.5% を含む、LB プロス培地 (1% バクトトリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl、pH7.0) 3 リットルを、100ml ずつ 500ml 容の坂口フラスコ 30 本に分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコに大腸菌 K12 株のスラント培養物を 1 白金耳接種し、36℃ で 1 日間 レシプロシェーカー (135 rpm) で培養した。培養後、培養液を集めて、遠心分離 (8,000 rpm 20 分間) し、菌体 (湿重量 32 g) を得た。この菌体を 100 ml の水に懸濁し、10℃ 以下で超音波で破碎した。破碎溶液は、pH6.8 を示し、この溶液を 1 N の NaOH 溶液で、pH7.0 に調製した後に、遠心分離 (16,000 rpm 20 分間) により、上清液を単離した。次に、上清液が 2mM Mg^{2+} になるように $MgSO_4$ を加えて、ブルートヨパールカラム (東ソー社: 20ml) にチャージし、2mM Mg^{2+} になるように添加した 20mM トリス緩衝液 pH7.0 50ml を通過させ、カラムを洗浄した。その後、1M KCl になるように添加した 20mM トリス緩衝液 pH7.0 50ml を通過させ、吸着タンパクを溶出させた。次に、溶出液を MW30000 cut off の限外ろ過装置で、濃縮を行ない、濃縮液に、20mM トリス緩衝液 pH7.0 50ml を加えて、再度濃縮し、脱塩濃縮液を得た。次に、この脱塩濃縮液を、DEAE トヨパールカラム (東ソー社: 20ml) にチャージし、20mM トリス緩衝液 pH7.0 から、500mM NaCl になるように添加した 20mM トリス緩衝液 pH7.0 の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、300mM で溶出した画分に活性があった。

【0103】

活性測定は、実施例 1 で上述した方法と同様で、340nm の吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

【0104】

300mM NaCl で溶出した画分は、再度限外ろ過装置で脱塩し、DEAE トヨパールカラム (東ソー社: 20ml) にチャージし、250mM NaCl になるように添加した 20mM トリス緩衝液 pH7.0 から、350mM NaCl になるように添加した 20mM トリス緩衝液 pH7.0 の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画する操作を 3 回行ない、共雑するタンパク質を除き、精製した。さらに、このシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素液を、それぞれ、限外ろ過装置で濃縮し、ゲルろ過カラム (東ソー社: 2000SWXL) にチャージし、溶出液に 200mM NaCl になるように添加した 20mM リン酸緩衝液 pH7.0 を用いて、精製した。

【0105】

このように精製された酵素液をスラブゲル SDS 電気泳動後、ゲルを取り出し、ゲルと同じ大きさの PVDF 膜 (イモビロン PSQ: ミリポア社製) にセミドライエレクトロブロット装置 (フナコシ社製) で吸着させた後、この PVDF 膜を取り出し、コマシプリリアントブルー染色液 (ラピッド CBB KANTO: 関東化学社製) で染色後脱色し、実施例 1 で記述した方法と同様にデンスitometer で純度を測定したところ、純度が 40% であった。さらに、前後に存在する不要なタンパク質を除くため、相当するタンパク質部分を切り取り、純度の高い、本発明酵素を得た。

【0106】

次に、PVDF 膜にある純度の高い、本発明酵素を、N 末端アミノ酸分析装置 (Hewlett Packard 社) により、分析を行なった。その結果、セリン-アスパラギン酸-アスパラギン-イソロイシン-アルギニンの配列が検出され、このような配列を有するタンパク質をコードする DNA を大腸菌全塩基配列データベース (データベース名「Colibri」) から検索したところ、ydgJ 遺伝子 (または b1624 遺伝子) が一致した。本遺伝子産物は酸化還元酵素の一種であると予想されているが、基質、生産物は全く不明のタンパク質であった。

【実施例 3】

【0107】

<大腸菌K12株 ATCC10798由来の本発明DNAの単離と発現>

本発明酵素をコードしていると思われるydgJ遺伝子を取得するために、まず、鋳型とする大腸菌K12株の全ゲノムを以下の様に抽出した。LBフラスコ培地100ml(1%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)にLBスラント培地(1%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)で培養した大腸菌K12株を一白金耳接種し、8時間、36℃で好氣的に培養し、これを集菌した。この菌体ペレットに、15mlのSaline-EDTA溶液(0.15M NaCl、0.1M EDTA、pH8.0)とリゾチーム50mgを加えて懸濁し、37℃、2時間作用させた。処理後、この溶液に25%SDS溶液を0.5ml加えて完全に溶菌させ、フェノールを3ml加えて、タンパク質を変成させた後に、遠心分離し、上清を取り出し、この溶液に20mlの2-プロパノールを加えて、粗ゲノムDNAを析出させた。析出した粗ゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させて、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥した粗ゲノムDNAは、さらに3ml TE液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に溶解後、0.01mgのRNAaseを加え、36℃、2時間反応させ、RNAを分解させた。さらに、0.01mgのプロテイナーゼKを加えて、36℃、2時間反応させ、タンパク質を分解させた。次に、1mlのフェノール-クロロホルム(1:1)混液を加えて、ゆっくりと攪拌し、RNAaseと、プロテイナーゼKを変成させ、遠心分離し、2相に分離した内の水相である上層を取り出し、これに3M酢酸Na溶液を0.3ml加えて、pH5.2に調製した。これに3mlの2-プロパノールを加えて、ゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させて、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥したゲノムDNAは、3ml TE液に溶解させ、これに1mlのフェノール-クロロホルム(1:1)混液を加える操作から、3ml TE液に溶解させる過程までを、再度繰り返して、遠心分離を行い、同様にpH5.2にて、上清に等量の2-プロパノールを加えて、大腸菌K12株のゲノムDNA溶液を調製した。このようにして得られたゲノムDNAをPCR反応のための鋳型DNA溶液とした。

【0108】

大腸菌K12株由来で、ydgJ遺伝子のリボソームバインディングサイト(RBS)を含む範囲をクローニングし、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列15: ydgj-F 5' - cattcaagcttaatgagaggcaatgacatgagcg-3'

配列16: ydgj-R 5' - tcggaattcttcatgcaaggcacaaagtcgc-3'

【0109】

PCR反応は宝酒造社のEx taq反应用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5μl、dNTP mixture 4μl、鋳型DNA 30ng、10μM プライマー溶液 各1μl、Takara ExTaq 0.5μlを50μlになるように水を加え、30μlのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置(ASTECH社 PC-700)を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを55℃1分、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.0 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50μlからジーンクリーン(Bio101社)を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300μl加えて混合し、10μl ガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500μlを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15μlの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12μlを得た。

【0110】

精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は以下の用に行った。すなわち、DNA断片溶液10μlに、発現用プラスミド(pUC119:宝酒造社製)を0.5μg、宝酒造社の制

制限酵素HindⅢとEcoRIを各1 μ l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液K buffer \times 10倍液 2 μ lを加え、20 μ lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36 $^{\circ}$ C、2時間反応した。制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20 μ lにキット添付のNaI溶液を300 μ l加えて混合し、10 μ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4 $^{\circ}$ C、15分静置した後、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 μ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 μ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55 $^{\circ}$ Cで、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12 μ lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。

【0111】

このようにして調製した溶液10 μ lにTakara Ligation kit-I溶液（宝酒造社）を10 μ l加え、16 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル（宝酒造社：DH5 α ）に形質転換させた。すなわち、4 $^{\circ}$ Cで解凍したコンピテントセル溶液60 μ lにライゲーション反応溶液を5 μ l加え、混合し、0 $^{\circ}$ C 30分後、42 $^{\circ}$ C 45秒、0 $^{\circ}$ C 2分の処理を行い、これに500 μ l SOC溶液（2%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、20mM グルコース、10mM MgSO₄、10mM MgCl₂）を加えて、36 $^{\circ}$ Cで1時間回復培養させ、この培養液100 μ lを、50 μ g/mlアンピシリン、40 μ g/ml X-gal（5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside）、1mM IPTG（チオガラクトピラノシド）を含むLB寒天培地（1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天）に塗布した。さらに37 $^{\circ}$ C、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これを選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン（50 μ g/ml）を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット（QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社）によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、目的とするydgJ遺伝子に相当する約1.0kbのDNA断片を有することが確認された。

【0112】

次に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50 μ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地（1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0）に移植し、36 $^{\circ}$ C 7時間培養し、この培養液に200mMチオガラクトピラノシド溶液を0.3ml加え、さらに36 $^{\circ}$ C 3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4 $^{\circ}$ Cで超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液2.8mlを取り出し、上清に1.2g硫酸を加え、4 $^{\circ}$ Cでタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離（15,000rpm、20min）で集め、上清を除去し、この沈殿物を2.5mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離（15,000rpm、20min）を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム（ファルマシア社：14ml）にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、ydgJ遺伝子産物の粗酵素液3.5mlを得た。

【0113】

シロイノシトールデヒドロゲナーゼの活性測定は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPH、1%シロイノソース）5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36 $^{\circ}$ C、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

【0114】

【实施例 4】

【0115】
 <大腸菌ydgJ遺伝子の相同性から推定されるホモログDNAの単離と発現、およびその諸性質>

ことが判明した。
 これらの細菌の中から、大腸菌ydgJ遺伝子の相同性から推定されるホモログDNAを検索した結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株 ATCC33970 (*Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970) ゲノム中のAtu4375遺伝子と、Atu3234遺伝子、バチルス ズブチリス168株 ATCC23857 (*Bacillus subtilis* 168 ATCC23857) ゲノム中のBG14057遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株 ATCC33913 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913) ゲノム中のXcc3438遺伝子ならびに、ミオイノシトールから直接にシロイノシトールへ変換する能力のある微生物も知られているアグロバクテリウム・エスピーAB10121株 FERM P-17383 (*Agrobacterium* sp. AB10121 FERM P-17383) ゲノム中のAtu4375遺伝子と、Atu3234遺伝子について大腸菌ydgJ遺伝子との相同性が認められた。従って、それぞれのDNAの単離と発現を行なった。

【0116】
上記の候補DNAを得る目的で、鋳型とするアグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC 33970、バチルス ズブチリス168株 ATCC 23857、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株 ATCC 33913および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株 FERM P-17383の全ゲノムを以下の様に抽出した。アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株は、LBフラスコ培地100ml（1%バクトートリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0）に、LBスラント培地（1%バクトートリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天）で培養したアグロバクテリウム チュメファシエンスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株をそれぞれ、一白金耳接種し、18時間

、27℃で好氣的に培養し、これを集菌した。この菌体ペレットに、15 mlのSaline-EDTA溶液 (0.15M NaCl、0.1M EDTA、pH8.0) とリゾチーム50mgを加えて懸濁し、37℃、2時間作用させた。処理後、この溶液に25% SDS溶液を0.5 ml加えて完全に溶菌させ、フェノールを3 ml加えて、タンパク質を変性させた後に、遠心分離し、上清を取り出し、この溶液に20 mlの2-プロパノールを加えて、粗ゲノムDNAを析出させた。析出した粗ゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥した粗ゲノムDNAは、さらに3 ml TE液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0) に溶解後、0.01mgのRNAaseを加え、36℃、2時間反応させ、RNAを分解させた。さらに、0.01mgのプロテイナーゼKを加えて、36℃、2時間反応させ、タンパク質を分解させた。次に、1mlのフェノールクロロホルム (1:1) 混液を加えて、ゆっくりと攪拌し、RNAaseと、プロテイナーゼKを変性させ、遠心分離し、2相に分離した内の水相である上層を取り出し、これに3M酢酸Na溶液を0.3ml加えて、pH5.2に調製した。これに3 mlの2-プロパノールを加えて、ゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥したゲノムDNAは、3 ml TE液に溶解させ、これに1mlのフェノールクロロホルム (1:1) 混液を加える操作から、3 ml TE液に溶解させる過程までを、再度繰り返して、遠心分離を行い、同様にpH5.2にて、上清に等量の2-プロパノールを加えて、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株のゲノムDNA溶液をそれぞれ、調製した。このようにして得られたゲノムDNAをPCR反応のための鋳型DNA溶液とした。

【0117】

バチルス ズブチリス168株 ATCC23857は、LBフラスコ培地100ml (1% バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0) にLBスラント培地 (1% バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天) で培養したバチルス ズブチリス168株を一白金耳接種し、18時間、36℃で好氣的に培養し、さらに、この内、1 mlを同様に調製したLBフラスコ培地100mlに加えて、4時間培養し、これを集菌した。集菌後の全ゲノムの抽出方法は、アグロバクテリウムで使用した方法と同様である。

【0118】

次に、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株ゲノム中のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株ゲノム中のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株ゲノム中のXcc3438遺伝子、のRBSを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列17: Atu4375-F 5' - ggcgatccttttgaaaggatagtcatgtcct -3'

配列18: Atu4375-R 5' - attggaagcttcgattggctgcgacctag -3'

配列19: Atu3234-F 5' - ttggatccttttcaggggaaatattatggc -3'

配列20: Atu3234-R 5' - gccgcaagcttggttttacagcttcac -3'

配列23: Xcc3438-F 5' - tcggaattcgcttgctggtgaatcgtttcaatg -3'

配列24: Xcc3438-R 5' - ataagaagcttgctcagtcgctgctgttccttc -3'

【0119】

バチルス ズブチリス168株ゲノム中のBG14057遺伝子のRBSを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。但し、5'末端から10番目のaは本来tであるが大腸菌での発現のためaに変更した。

配列21: BG14057-F 5' - aggaattcgatgataacgcttttaaggaggagaa -3'

配列22: BG14057-R 5' - tttctgcagtttagtgctccagcataatggttcg -3'

【0120】

PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5μl、dNTP mixture 4μl、鋳型DNA 30ng、10μM プライマー溶液 各1μl、Taka

ra ExTaq 0.5 μ lを50 μ lになるように水を加え、30 μ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECC社 PC-700) を用い、変成を94℃で30秒、アニーリングを52℃、55℃または58℃ (表1参照) で1分、伸長を72℃で1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.1 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。

【0121】

【表1】

<表1: アニーリング温度一覧>

対象遺伝子	アニーリング温度
Agrobacterium tumefaciens C58 ATCC33970 の Atu4375 遺伝子用	55℃
Agrobacterium AB10121 FERM P-17383 の Atu4375 遺伝子用	55℃
Agrobacterium tumefaciens C58 ATCC33970 の Atu3234 遺伝子用	52℃
Agrobacterium AB10121 FERM P-17383 の Atu3234 遺伝子用	52℃
Bacillus subtilis 168 ATCC23857 の BG14057 遺伝子用	55℃
Xanthomonas campestris pv. Campestris ATCC33913 の Xcc3438 遺伝子用	58℃

【0122】

反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50 μ lからジーンクリーン (Bio101社) を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300 μ l加えて混合し、10 μ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 μ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 μ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12 μ lを得た。

【0123】

精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は、それぞれ以下に示す組合せで行った。すなわち、DNA断片溶液10 μ lに、発現用プラスミド (pUC118: 宝酒造社製) を0.5 μ g、宝酒造社の制限酵素2種類を各1 μ l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液buffer×10倍液2 μ lを加え、20 μ lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36℃、2時間反応した。AB10121株のAtu3234遺伝子は、Hind IIIサイトを有するため、制限酵素処理せず、単離後、pT7Blueベクター (Novagen社製) とライゲーションさせた。

【0124】

【表2】

<表2: 発現用プラスミド、使用した制限酵素一覧>

対象遺伝子	発現用プラスミド	使用した制限酵素
A.tume.C58 の Atu4375 遺伝子用	pUC118	BamHI, HindIII / K buffer
AB10121 株の Atu4375 遺伝子用	pUC118	BamHI, HindIII / K buffer
A.tume.C58 の Atu3234 遺伝子用	pUC118	BamHI, HindIII / K buffer
AB10121 株の Atu3234 遺伝子用	pT7Blue	未使用
B.sub.168 の BG14057 遺伝子用	pUC118	EcoRI, PstI / H buffer
X.camp. の Xcc3438 遺伝子用	pUC118	EcoRI, HindIII / K buffer

【0125】

制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20 μ lにキット添付のNaI溶液を300 μ l加えて混合し、10 μ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 μ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 μ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12 μ lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目

的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。

【0126】

このようにして調製した溶液10 μ lにTakara Ligation kit-I溶液(宝酒造社)を10 μ l加え、16℃、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル(宝酒造社:DH5 α)に形質転換させた。すなわち、4℃で解凍したコンピテントセル溶液60 μ lにライゲーション反応溶液を5 μ l加え、混合し、0℃30分後、42℃45秒、0℃2分の処理を行い、これに500 μ l SOC溶液(2%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、20mM グルコース、10mM MgSO₄、10mM MgCl₂)を加えて、36℃で1時間回復培養させ、この培養液100 μ lを、50 μ g/mlアンピシリン、40 μ g/ml X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside)、1mM IPTG (チオガラクトピラノシド)を含むLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)に塗布した。さらに37℃、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これを選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン(50 μ g/ml)を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット(QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、それぞれ、目的とするDNAに相当する約1.0~1.1kbpのDNA断片を有することが確認された。

【0127】

次に、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50 μ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)に移植し、36℃7時間培養し、この培養液に200mMチオガラクトピラノシド溶液を0.3ml加え、さらに36℃、3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4℃で超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液2.8mlを取り出し、上清に1.2g硫酸を加え、4℃でタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離で集め、上清を除去し、この沈殿物を2.5mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム(14ml)にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、それぞれの遺伝子産物の粗酵素液3.5mlを得た。

【0128】

シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの活性測定は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPH、1%シロ-イノソース)5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

【0129】

また、酵素反応生産物の測定は、シロ-イノソース10mg、NADPH40mg、酵素10U相当を含む100mMトリス緩衝液(pH8.0)1.0mlで、36℃で4時間反応後、80℃、10minの加熱処理を行ない、冷却後、強塩基性陽イオン交換樹脂100 μ l、強酸性陰イオン交換樹脂100 μ l、活性炭10mgを加えて攪拌し、遠心分離後、上清を2倍希釈し、HPLC(Shodex Asahipak NH2P-50 4E ϕ 4.6 \times 250mm:Shodex製)にて、カラム温度40℃、移動相流速1.5ml(80%アセトニトリル)、RI検出器で測定した。その結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子産物、キサントモナス キャンベストリス pv. キャンベストリス株のXcc3438遺伝子産物、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物は、高い酵素活性を示し、その生産物は、すべて、100%シロ-イノシトールへ還元されたものであり、異性体であるミオ-イノシトールは検出されなかった。結果として、上述した遺伝子由来のリコンビナント酵素は、全て高いシロ-イノシトールデヒドロゲナー

ゼ活性を有し、この遺伝子産物が、シロイノシトールデヒドロゲナーゼであることを確認した。また、シロイノソースからの還元反応物は、シロイノシトールのみ検出され、立体特異的に、シロイノシトールへ還元する酵素であった。

【0130】

アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株由来のAtu4375遺伝子配列は配列番号3に、相当するアミノ酸配列は配列番号4に、Atu3234遺伝子配列は配列番号5に、相当するアミノ酸配列は配列番号6に記載した。また、バチルス ズブチリス168株由来のBG14057遺伝子配列は配列番号7に、相当するアミノ酸配列は配列番号8に、AB10121株由来のAtu4375遺伝子配列は配列番号9に、相当するアミノ酸配列は配列番号10に、Atu3234遺伝子配列は配列番号11に、相当するアミノ酸配列は配列番号12に、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株由来のXcc3438遺伝子配列は配列番号13に、相当するアミノ酸配列は配列番号14に記載した。また、AB10121株のAtu4375遺伝子と、Atu3234遺伝子を含むプラスミドの塩基配列解析（北海道システムサイエンス社）の結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子と、AB10121株のAtu4375遺伝子とは、塩基配列上の相同性は89%、アミノ酸配列上の相同性は96%であり、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu3234遺伝子と、AB10121株のAtu3234遺伝子の塩基配列上の相同性は87%、アミノ酸配列上の相同性は95%であった。

【実施例5】

【0131】

＜本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼの諸性質の検討＞

実施例1の酵素精製により得られたAB10281株由来のSIDH1、SIDH2、SIDH3と、実施例3のリコンビナント酵素として得られた大腸菌由来のydgJ遺伝子産物と、実施例4のリコンビナント酵素として得られたアグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子産物、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株のXcc3438遺伝子産物、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物の酵素としての諸性質を以下に示す方法で検討し、その結果を表3に記載した。

【0132】

また、表4はアミノ酸配列の相同性を示した表であり、全てに共通したアミノ酸だけの相同性は、約6%で低い相同性であるが、似た性質を有するアミノ酸まで含めると、特にN末端の前半約30%はNADまたはNADP結合ドメインは、相同性が高いことが判った。さらにNADまたはNADPの酸化還元作用部位であるニコチンアミドの結合に関与する配列中央前半寄りのリジン-プロリン配列はよく保存されていた。配列中央のヒスチジン（またはグルタミン）-アスパラギン配列と、アスパラギン酸-（3アミノ酸）-ヒスチジン配列もよく保存されており、推定三次元構造から基質結合に関与する重要な配列と考えられる。表中、共通した配列は「*」印で、性質の似たアミノ酸は「:」印、または「.」印で、リジン-プロリン配列、ヒスチジン（またはグルタミン）-アスパラギン配列、アスパラギン酸-（3アミノ酸）-ヒスチジン配列は網掛けで示した。

【0133】

分子量の比較は、AB10281株由来の本発明酵素は、分子量マーカー（プレステイン・スタンダード（ブロードレンジタイプ）：バイオラッド社製）を指標としたSDS-PAGEの結果から、他の本発明酵素は遺伝子の全長から推定される酵素の分子量を算出した。その結果、酵素精製により得られたAB10281株由来の本発明酵素SIDH1、SIDH2、SIDH3の分子量は、それぞれ46kダルトン、42kダルトン、40kダルトンであった。また、実施例3のリコンビナント酵素として得られた大腸菌K-12株由来のydgJ遺伝子由来の本発明酵素の分子量は38.2kダルトン、実施例4のリコンビナント酵素として得られたアグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子由来の本発明酵素の分子量はそれぞれ41.3kダルトン、42.4kダルトン、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv.

キャンベストリス株のXcc3438遺伝子、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子由来の本発明酵素の分子量はそれぞれ40.1kダルトン、38.5kダルトン、41.4kダルトン、42.5kダルトンであった。つまり、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは38~46kダルトンの分子量を示すことが判明した。

【0134】

本発明酵素の会合特性は、ゲルろ過カラム（東ソー社：2000SWXL）で分画した画分の活性を測定し、相当する分子量画分から、分子量を計算し、これを、酵素の分子量で割った値を整数化した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、80k~110kダルトンの分子量を示し、未変性状態では2または3量体を形成していると考えられた。

【0135】

本発明酵素の補酵素の選択性は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPHまたはNADH、1%シロイノソース）5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、NADPH、NADHの何れも補酵素として使用できるが、表3に示すような補酵素相対活性を示した。NADPHに対して良く作用する酵素が多いことが判った。

【0136】

本発明酵素の至適pHは、反応液（200mMリン酸緩衝液pH5.0~9.0、2% NADPH、1%シロイノソース）5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、表3に示すような至適pHを示した。つまり、本発明酵素はpH5~9の広い範囲で作用することが判った。また、最大活性が酸性側のpH6付近の酵素と、中性域pH6.5~7.5付近の酵素と、アルカリ性側のpH7.5~9付近にある酵素があることもわかった。

【0137】

本発明酵素の熱安定性は、酵素液を所定の温度で10min間処理した後、冷却し、この酵素液と反応液（200mMリン酸緩衝液pH5.0~9.0、2% NADPH、1%シロイノソース）5 μ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。20℃、10min処理区の活性を100%として相対活性を比較した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性は、表3に示すように各酵素によって異なり、酵素によりその安定性は40~60℃まで異なることが判った。

【0138】

本発明酵素の重金属効果は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPH、1%シロイノソース、2mM金属塩）5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。金属塩の種類は、CaCl₂、CoCl₂、ZnSO₄、MgSO₄、SnCl₂、NiCl₂、MnSO₄を使用し、無添加区の活性を100%として相対活性を比較した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは表3に示すように、少なくとも、Co²⁺イオンの存在下で活性化され、Sn²⁺イオンの存在下で阻害された。ほとんどの酵素はZn²⁺イオンの存在下で阻害されるが、バチルス ズブチリス168株由来の酵素は逆に、Zn²⁺イオンの存在下で活性化された。

【0139】

本発明酵素のシロイノソースに対するKm値は、反応液（200mMトリス緩衝液pH8.0、2%

NADPH、0.001~2.5%シロイノソース) 5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃30min反応後、ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。値は逆数プロットされ、Km値を算出した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼのKm値は表3に示すように、2.6~12.6mMの範囲を示した。

【0140】

本発明酵素の基質特異性は、酸化活性を指標にシロイノシトールに対する反応性に対する相対活性を測定した。使用したイノシトール異性体は、シロイノシトール(SI)、ミオイノシトール(MI)、D-キロイノシトール(DCI)、L-キロイノシトール(LCI)、エピーイノシトール(EI)、ムコイノシトール(MuI)、アロイノシトール(AI)、ネオイノシトール(NI)である。表3には相対活性が70%以上の区、70%未満20%以上の区、20%未満の区で表示した。

【0141】

基質特異性の測定方法は、反応液(各種イノシトール異性体1%(ネオイノシトールのみ0.4%)、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002%NADP⁺、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー) 50 μ lと、酵素液50 μ lを混合し、25℃、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定した。時間毎の吸光度の増分から反応速度を算出した結果、酵素の種類別に基質特異性は若干異なり、イノシトール異性体構造との相関から、少なくとも、これらの酵素がシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性と、ミオイノシトール5-デヒドロゲナーゼ活性を有していることも判明した。

【0142】

【表3】

＜表3:各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼの諸性質一覧＞

菌株	E.coli K12 (ATCC10798)	Acetobacter sp. AB10281 (FERM P-18868)			Burillus sub. 168株 (ATCC23857)
遺伝子名または酵素名	vdgA遺伝子	SIDH1	SIDH2	SIDH3	BG14057遺伝子
分子量 kDa	38.2k	46k(SDS+)	42k(SDS+)	40k(SDS+)	40.1k
会合特性	2量体	3量体	2量体	2量体	2量体
熱安定性	45℃まで安定	45℃まで安定	60℃まで安定	60℃まで安定	40℃まで安定
補酵素相対活性	NADPH:NADH =100:9	NADPH:NADH =100:112	NADPH:NADH =100:1	NADPH:NADH =100:3	NADPH:NADH =100:52
至適pH	pH7.5~9.0	pH5.5~6.5	pH5.5~6.5	pH5.5~6.5	pH7.0~8.5
重金属効果:活性化	Co	Co	Co	Co,Mn	Co,Mn,Zn
重金属効果:強阻害	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn
還元反応生成物	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ
シロイノソースに対するKm値	3.9mM	7.8mM	10.6mM	12.6mM	3.5mM
基質特異性 相対活性 (70%以上)	SI,MI,DCI	SI	SI	SI	SI,MI
基質特異性 相対活性 (20~70%)	LCI,EI,MuI	MI	MI	MI	DCI,EI,AI,NI
基質特異性 相対活性 (20%未満)	AI,NI	DCI,LCI,EI,MuI, AI,NI	DCI,LCI,EI,MuI, AI,NI	DCI,LCI,EI,MuI, AI,NI	LCI,MuI

菌株	Agrobacterium tumefaciens C58 (ATCC33970)		Agrobacterium sp. AB10121 (FERM P-17383)		Xanthomonas campestris pv. Campestris (ATCC33913)
遺伝子名または酵素名	Atu4375遺伝子	Atu3234遺伝子	Atu4375遺伝子	Atu3234遺伝子	Xcc3438遺伝子
分子量 kDa	41.3k	42.4k	41.4k	42.5k	38.5k
会合特性	2量体	2量体	2量体	2量体	2量体
熱安定性	50℃まで安定	40℃まで安定	50℃まで安定	40℃まで安定	40℃まで安定
補酵素相対活性	NADPH:NADH =100:9	NADPH:NADH =100:18	NADPH:NADH =100:6	NADPH:NADH =100:20	NADPH:NADH =100:34
至適pH	pH6.5~8.5	pH7.0~8.5	pH6.5~8.5	pH7.0~8.5	pH6.5~7.5
重金属効果:活性化	Co,Mn	Co,Mn,Ca	Co,Mn	Co,Mn,Ca	Co
重金属効果:強阻害	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn,Zn	Sn,Zn
還元反応生成物	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ
シロイノソースに対するKm値	9.2mM	2.6mM	9.8mM	3.1mM	9.1mM
基質特異性 相対活性 (70%以上)	SI,MI,DCI,EI	SI,MI,DCI,EI,LCI	SI,MI,DCI,EI	SI,MI,DCI,EI,LCI	SI,DCI
基質特異性 相対活性 (20~70%)	LCI,MuI	MuI	LCI,MuI	MuI	MI
基質特異性 相対活性 (20%未満)	AI,NI	AI,NI	AI,NI	AI,NI	EI,LCI,MuI,AI,NI

略号 SIS:シロイノソース, SI:シロイノシトール, MI:ミオイノシトール, DCI:D-キロイノシトール,
LCI:L-キロイノシトール, EI:エピーイノシトール, MuI:ムコイノシトール, AI:アロイノシトール, NI:ネオイノシトール

【0143】

【表 4-1】

<表 4-1: 各種シロイノシールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列相同性>

E. coli. ydgJ	————MSDNIRVGLIGYGYASKTFHAPLIAGTPGGELAVIS—SSDETKVKADW
X. camp. Xcc3438	————MPKPFNLAVVGYGYGRTFHAPLIASPTGLQLHSVV—SSKPOQPOADF
B. sub. BG14057	—MITLLKGRRKVDITKVGILGYGLSGSVFHGPLLDVLEVOISKIM—TSRTEEVKRF
A. tume. Atu4375	—MSSATKKFDSRRIRLGMVGGGGGAFIGAVHRI AARLDDRYELVAGALSSDPARAAASA
AB10121Atu4375	—MSSAPKKFDSRRIRLGMVGGGGGAFIGAVHRI AARLDDRYELVAGALSSDPARAAASA
A. tume. Atu3234	MAIEGKTTDVANKRIRLGMVGGGGGAFIGGVHRAARLDNRFDLVAGALSSTPEKSLASG
AB10121Atu3234	MAIEGKTTDKANKRIRLGMVGGGGGAFIGGVHRAARLDNRFDLVAGALSSTPEKSLASG
	: : : : * * . . : : : : *
E. coli. ydgJ	PTVTVSE————PKHLFNDPNI DLIVIPNDTHFPLAKAALEAGKHVVVDKPF
X. camp. Xcc3438	REVRVLPD————LEAALADPALDAVVIATPNOTHAPMALQALAAGKHVLDKPF
B. sub. BG14057	PDAEVVHE————LEEITNDPAIELVIVTTPSGLHYEHTMACIQAGKHVMEKPM
A. tume. Atu4375	TLLGIAPERSYASFEDMAATEAGREDGIEAVAIVTPNHLHFAPSKAFLEAGIHVICDKPV
AB10121Atu4375	TLLGIAPERSYASFEEMAAEAGRDDGIEAVAIVTPNHLHFAPSKAFLEAGIHVICDKPV
A. tume. Atu3234	RELGLDSERCYGSFEEMAEKEALREDGIEAVAIVTPNHVHYPAAKAFLEAGIHVICDKPL
AB10121Atu3234	RELGLDPERCYGSFEEMAEKEALREDGIEAVAIVTPNHVHYPAAKAFLEAGIHVICDKPL
	: : : : : : : : : : ** * : : : * ** : **
E. coli. ydgJ	TVTLQAARELDALAKSLGRVLSVFTIRRWDSDFLTLKGLLAEGVLGEVAYFESHDFRFRP
X. camp. Xcc3438	ALDAAQARTYVDAAEAGKIVSVFTIRRWDAFLTVRRLIEDGGLGEVVFESHDFRYRP
B. sub. BG14057	TATAEEGETLKRAADEKGVLLSVYFTIRRWDFLTIKKLISEGSLIEDINTYQVSYNRYRP
A. tume. Atu4375	TATLEEAKALAGIVRASDSLFVLTINITYGYAMLROMREMI AEGAIGKLRHVQAEYAQDWL
AB10121Atu4375	TATLEEAKALAEIVRASDSLFVLTINITYGYAMLROMRNVADGAI GKL RHVQAEYAQDWL
A. tume. Atu3234	TSNLEDAKKLKDVADKADALFILTINITYGYPMVRHARELVEAGALGNIRLVQMEYPODWL
AB10121Atu3234	TSNLEDAKKLKDVADKADALFILTINITYGYPMVRHARELVEAGALGTIRLVQMEYPODWL
	: . . . : . . : : : * . . : : : * : : : : : :
E. coli. ydgJ	————QVRDRWREQGGP—GSGIWWYELAPHLDDQAITLFG—LPVSMITVDLAQLRPGA
X. camp. Xcc3438	————QVRDRWRESDIP—GAGLWYELGPHLLDQALQLFG—MPQAI SADLORQRTQA
B. sub. BG14057	————EVGARWREKEGT—ATGTLYDLGSHIIDOTLHLFG—MPKAVTANVMAQRENA
A. tume. Atu4375	TEAVEKTGAKGAEMRTDPSRSGAGGAI GGI GTI AFNAAAFVTGEI PSSLYADLTSFVPGR
AB10121Atu4375	TEAVEKTGAKGAEMRTDPSRSGAGGAI GGI GTI AFNAAAFVTGEI PKSLYADLTSFVPGR
A. tume. Atu3234	TEAVEQTGAKQAVVRTDPAQSGVGGSTGGI GTI AYNLGCFI SGLEADELAADVHTFVEGR
AB10121Atu3234	AEP I EOTGAKQAVVRTDPAQSGAGGSTGGI GTI AYNLGCFI SGLEVDELAADVHTFVEGR
	** . . * * . . : : * . . : : :

【表 4-2】

<表 4-2: 各種シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列相同性>

E. coli. ydgJ	QSTDYFHAILSYPR-----RVILHGTMLAAESARYIVHGSRGSYVKYGLDPQEER
X. camp. Xcc3438	RSDDYFNVLRYPR-----RVILHAGSLVADGSLRFVAVHGTGRGSLKHGADTQEDQ
B. sub. BG14057	ETVDYFHLTLDYGL-----QAILYGGSIVPANGPRYQIHGKDSFIFYGIDGQEDA
A. tume. Atu4375	QLDDSANILLRYDSG-----AKGMLWASQI AVGNENALSLRVYGDKGGLWHRVPDELW
AB10121Atu4375	QLDDSANILLRYESG-----AKGMLWASQI AVGNENALSLRVYGEKGGLWHRVPDELW
A. tume. Atu3234	RLDDNAHVMMRFKPKGGKQPARGMLWCSQVAVGHENGLKIRLYGDKAGLEWTOADPNYLW
AB10121Atu3234	RLDDNAHVMLRFKPKGGKQPAKGLLWCSQVAVGHENGLKVRVYGDKAGIEWTOADPNYLW

E. coli. ydgJ	LKNGERLP-----QEDWGYDMRD-----GVLTRVEGEERVEETLLT-VPGNYPAYYAAIRDAL
X. camp. Xcc3438	LRAGRPP-----TAGWGMPLP-----GTLTRVDDEGRVHTHQPDPGVPDYRHGYAARDAM
B. sub. BG14057	LRAGRKE-----DDSWGADVPEFYGLTTIRGSDKKTETIPS-VNGSYLTYRKIAESI
A. tume. Atu4375	FTPYGEPKRLITRNGAGAGAAANRVSRVPSGHPEGYLEGFATI-YREAADAIAKREGET
AB10121Atu4375	FTPYGEPKRLITRNGAGAGAAANRVSRVPSGHPEGYLEGFATI-YREAADAIAKREGKA
A. tume. Atu3234	FTKLGEPKQLITRGGAGAGAAAARVTRIPSGHPEGYLEAFATI-YTEAHAIEARRTGSA
AB10121Atu3234	FTKLGEKQLITRGGAGAGAAAARVTRIPSGHPEGYLEAFATI-YTEAHAIEARRTGSV

E. coli. ydgJ	NGDGENPVPASQAIQVMELIELGIESAKHRATLCLA-----
X. camp. Xcc3438	AGTAPPPVSAADAVRLWELLELAQRGAALGVWLWLEGNSSD
B. sub. BG14057	REGAALPVTAEEGINVIRIEAAMESSEKERTIMLEH-----
A. tume. Atu4375	AAGEVIYPGMEDGLAGLAFIDAAVRSSQ-TSTWVGIDI-----
AB10121Atu4375	AAGEVIYPGMEDGLAGLAFIDAAVRSSQ-TSTWINIDI-----
A. tume. Atu3234	LDKAVIYPTVDDGVKGVAFTACIESGKKNGVVVKL-----
AB10121Atu3234	LDKAVIYPTVDDGVKGVAFTACIESGKKNGVVVKL-----

【実施例 6】

【0144】

<本発明酵素を用いたシロ-イノシトールの製造>

本製造法で使用する酵素は、ミオ-イノシトール 2-デヒドロゲナーゼと、本発明酵素の 2 種類が必要である。ここでは、バチルス ズブチリス 168 株 ATCC 23857 由来の BG10669 遺伝子産物であるミオ-イノシトール 2-デヒドロゲナーゼのリコンビナント酵素と、本発明 DNA によりコードされる (大腸菌 K12 株由来 ydgJ 遺伝子: 配列番号 1) 本発明酵素のリコンビナント酵素を用いた実施例を示す。

【0145】

始めに、バチルス ズブチリス 168 株 ATCC 23857 由来の BG10669 遺伝子産物であるミオ-イノシトール 2-デヒドロゲナーゼのリコンビナント酵素を得るために以下の実験を行なった。バチルス ズブチリス 168 株由来の BG10669 遺伝子のクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR 反応を行った。

配列 25: BG10669-F 5' - ttgggatccgatgagtttacgtattggcgtaattg -3'

配列 26: BG10669-R 5' -aaactgcagtttagttttgaactgttgtaaaagattgata -3'

【0146】

PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5 μ l、dNTP mixture 4 μ l、鋳型DNA 30ng、10 μ M プライマー溶液 各1 μ l、Takara ExTaq 0.5 μ lを50 μ lになるように水を加え、30 μ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECS社 PC-700) を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを53℃1分、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.0 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50 μ lからジーンクリーン (Bio101社) を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300 μ l加えて混合し、10 μ l ガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 μ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 μ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12 μ lを得た。

【0147】

精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は以下の用に行った。すなわち、DNA断片溶液10 μ lに、発現用プラスミド (pUC118: 宝酒造社製) を0.5 μ g、宝酒造社の制限酵素BamHI、Pst Iを各1 μ l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液K buffer×10倍液 2 μ lを加え、20 μ lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36℃、2時間反応した。制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20 μ lにキット添付のNaI溶液を300 μ l加えて混合し、10 μ l ガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 μ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 μ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12 μ lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。

【0148】

このようにして調製した溶液10 μ lにTakara Ligation kit-I溶液 (宝酒造社) を10 μ l加え、16℃、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル (宝酒造社: DH5 α) に形質転換させた。すなわち、4℃で解凍したコンピテントセル溶液60 μ lにライゲーション反応溶液を5 μ l加え、混合し、0℃30分後、42℃45秒、0℃2分の処理を行い、これに500 μ l SOC溶液 (2%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、20mM グルコース、10mM MgSO₄、10mM MgCl₂) を加えて、36℃で1時間回復培養させ、この培養液100 μ lを、50 μ g/mlアンピシリン、40 μ g/ml X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside)、1mM IPTG (チオガラクトピラノシド) を含むLB寒天培地 (1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天) に塗布した。さらに37℃、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これを選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン (50 μ g/ml) を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット (QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社) によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、目的とするBG10669遺伝子に相当する約1.0kbpのDNA断片を有することが確認された。

【0149】

次に、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50 μ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地 (1%バクトトリプトン、0.

5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0) 30本に移植し、36℃7時間培養し、この培養液100ml毎に200mMチオガラクトピラノシド溶液を0.3ml加え、さらに36℃3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4℃で超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液84mlを取り出し、上清に36g硫酸を加え、4℃でタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離で集め、上清を除去し、この沈殿物を75mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム (ファルマシア製) (400ml) にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、BG10669遺伝子産物であるの粗酵素液105mlを得た。

【0150】

ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ還元活性は以下のように測定した。反応液 (200mM トリス緩衝液pH8.0、2% NADH、1%シロ-イノソース) 5 μ lと、酵素液5 μ lを混合し、36℃で30min反応後ただちに、500 μ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験管のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば酵素液は希釈を行い、シロ-イノソースの還元活性があることを確認した。一方、酸化活性の測定方法は、反応液 (ミオ-イノシトールまたはシロ-イノシトール1%、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002% NAD⁺、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー) 50 μ lと、酵素液50 μ lを混合し、25℃、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定した。時間毎の吸光度の増分から反応速度を算出し、調製された酵素の酸化活性がミオ-イノシトールに活性を示し、シロ-イノシトールに活性を示さないことを確認した。

【0151】

このようにして調製されたミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ酵素溶液と、実施例3で調整されたシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ粗酵素溶液 (30倍スケールである3L培養液から調製した酵素液105ml) を用いて、ミオ-イノシトールからシロ-イノシトールへの変換反応を行なった。反応溶液は、ミオ-イノシトール200g、5%シロ-イノソース70ml、CoCl₂130mg、MgSO₄·7H₂O 250mgと、水を加えて750mlにし、50℃まで加熱して、ミオ-イノシトールを溶解させる。これを36℃まで冷却し、1N NaOH水溶液でpH8.0に調製し、水を加えて790mlにする。これに36℃で、ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼの粗酵素液105ml、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ粗酵素溶液105ml、NADP⁺ 70mgを加えて、約1Lになる溶液を、36℃で保温し、ゆっくり攪拌しながら、反応させる。反応液はpHが徐々に酸性になるため、1N NaOHでpH8.0になるように調製する。42時間後、反応液中にシロ-イノシトールの結晶が生じ、白濁した反応液が得られる。この溶液をろ紙を用いて、ろ過し、結晶性シロ-イノシトール (湿重量73g) を回収した。この固体に3Lの水を加えて、50℃で溶解させ、4.5Lになるように水を加えて、室温まで冷却し、得られた溶液を遠心分離 (8,000 rpm 20分間) して、微量な不溶物を除去した上清液を、強塩基性陽イオン交換樹脂100mlカラム、強酸性陰イオン交換樹脂100mlカラム、活性炭50mlカラムの順に通過させて溶出させた溶出液を得た後に、カラム洗浄のために500mlの水を順に通過させ溶出させた洗浄液と、溶出液を一緒にして、濃縮した。

【0152】

濃縮は、溶液の量が少なくなると、シロ-イノシトールの微結晶が析出し始め、内容物が130gになるまで濃縮し、これを4℃まで冷却後、一晚放置した。放置後、スラリー状になった物質をろ過し、ろ紙上のシロ-イノシトールの結晶を少量の水で洗浄後、105℃で3hr乾燥させた。得られたシロ-イノシトールは白色の結晶 (61g) で、NMR分析、およびHPLC分析では、他に不純物は認められず、純度99%以上のものであった。ミオ-イノシトールからの収率は31%であった。また、ろ別された反応液は、まだ、使用可能であり、ミオ-イノシトールを64g溶解させると、さらに、結晶性シロ-イノシトールが析出した。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 3 】

【 図 1 】 図1は酵素の共役によるシロイノシトールの製造原理を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hokko Chemical Indutry Co., Ltd.

<120> DNA encoding scyllo-inositol dehydrogenase

<130> P-C40677

<160> 26

<170> PatentIn Ver.2.1

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

```

atgagcgaca acatccgtgt tgggttgatt gggatatggtt atgcgagcaa aaccttccat      60
gcgcccctga ttgcgggcac gcccgggcag gaactggcgg taatctccag cagtgatgaa      120
acaaaagtaa aagccgactg gccaacgggtt acggttgtct ctgagccgaa gcatctgttt      180
aacgatccca acatagacct gattgtcatt cctacacca acgatacca tttcccgtta      240
gccaaagcgg cgcttgaggc gggtaaacad gtggtcgttg ataaaccctt taccgtgaca      300
ctgtcacaag cgcgagagct ggatgcgctg gcaaaaagcc tggggcgtgt gctgtctgta      360
ttccataacc gtcgctggga tagcgatttc ttgacgctaa aaggtttact cgcggaaggc      420
gtgctgggtg aagttgctta ctttgagtct catittgacc gcttccgtcc gcaggtgcgc      480
gatcgttggc gtgaacaggg cggcccaggc agcggtatct ggtacgattt agcaccacat      540
cttcttgatc aggccattac gctttttggt ttaccggtca gcatgacggg agatttggca      600
cagttacggc ccggagcgca gtcgaccgat tatttccacg ccattctgtc ctatccacag      660
cggcgagtca ttttacacgg taccatgctg gcagccgctg agtcagcacg gtatatcgtg      720
catggatccc gaggcagtta tgtgaaatat ggcctcgatc cacaggaaga acgtctgaaa      780
aatggcgagc gtctaccgca ggaagactgg ggctacgata tgcgtgatgg cgtacttacc      840
cgcgtggaag gtgaggaacg tgtcgaagaa acgctgttga cgggtgcctgg gaattatccg      900
gcttactatg cggctattcg tgatgcgtta aatggcgatg gtgaaaatcc ggttccggca      960
agccaggcaa tccaggtaat ggagttgatt gagctgggca tcgaatccgc caaacatcgc     1020
gcgactttgt gccttgcattg a                                     1041

```

<210>2

<211>346

<212>PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

```

Met Ser Asp Asn Ile Arg Val Gly Leu Ile Gly Tyr Gly Tyr Ala Ser
      5              10              15
Lys Thr Phe His Ala Pro Leu Ile Ala Gly Thr Pro Gly Gln Glu Leu
      20              25              30
Ala Val Ile Ser Ser Ser Asp Glu Thr Lys Val Lys Ala Asp Trp Pro
      35              40              45

```

Thr Val Thr Val Val Ser Glu Pro Lys His Leu Phe Asn Asp Pro Asn
 50 55 60
 Ile Asp Leu Ile Val Ile Pro Thr Pro Asn Asp Thr His Phe Pro Leu
 65 70 75 80
 Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Gly Lys His Val Val Val Asp Lys Pro
 85 90 95
 Phe Thr Val Thr Leu Ser Gln Ala Arg Glu Leu Asp Ala Leu Ala Lys
 100 105 110
 Ser Leu Gly Arg Val Leu Ser Val Phe His Asn Arg Arg Trp Asp Ser
 115 120 125
 Asp Phe Leu Thr Leu Lys Gly Leu Leu Ala Glu Gly Val Leu Gly Glu
 130 135 140
 Val Ala Tyr Phe Glu Ser His Phe Asp Arg Phe Arg Pro Gln Val Arg
 145 150 155 160
 Asp Arg Trp Arg Glu Gln Gly Gly Pro Gly Ser Gly Ile Trp Tyr Asp
 165 170 175
 Leu Ala Pro His Leu Leu Asp Gln Ala Ile Thr Leu Phe Gly Leu Pro
 180 185 190
 Val Ser Met Thr Val Asp Leu Ala Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Ser
 195 200 205
 Thr Asp Tyr Phe His Ala Ile Leu Ser Tyr Pro Gln Arg Arg Val Ile
 210 215 220
 Leu His Gly Thr Met Leu Ala Ala Ala Glu Ser Ala Arg Tyr Ile Val
 225 230 235 240
 His Gly Ser Arg Gly Ser Tyr Val Lys Tyr Gly Leu Asp Pro Gln Glu
 245 250 255
 Glu Arg Leu Lys Asn Gly Glu Arg Leu Pro Gln Glu Asp Trp Gly Tyr
 260 265 270
 Asp Met Arg Asp Gly Val Leu Thr Arg Val Glu Gly Glu Glu Arg Val
 275 280 285
 Glu Glu Thr Leu Leu Thr Val Pro Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Tyr Ala
 290 295 300
 Ala Ile Arg Asp Ala Leu Asn Gly Asp Gly Glu Asn Pro Val Pro Ala
 305 310 315 320
 Ser Gln Ala Ile Gln Val Met Glu Leu Ile Glu Leu Gly Ile Glu Ser
 325 330 335
 Ala Lys His Arg Ala Thr Leu Cys Leu Ala
 340 345

<210> 3
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 3
 atgtcctccg ctacaaagaa attcgatagt cgccgcattc gtctcggtat ggctcggcggc 60
 ggctcagggcg ccttcattgg cgcggtgcat cgcacgcgg cccggctgga tgaccgttac 120
 gagctgggtgg ccggagcgct ttcctccgat cccgcgcgtg ccgccgcctc ggcaacactg 180
 ctcggcattg cgccggagcg ctcctatgcc tcgttcgagg acatggcggc gactgaggcc 240
 ggccgggagg atggcatcga ggcagtcgcc atcgtcaccc ccaaccatct gcattttgcc 300

```

ccgtccaagg cctttctcga agccggcatc cacgtcatct gcgacaagcc ggtgaccgcg 360
acgctggaag aagcgaaggc actggccggg atcgtcagag cctcggatag ccttttcgtg 420
ctgacgcata actacaccgg ttacgccatg ctgcggcaga tgcgcgagat gatcgctgaa 480
ggcgccattg gcaagctgcg ccatgtccag gccgaatatg cgcaggactg gctgaccgaa 540
gcggctcga aaaccggcgc aaaagggtgcg gaatggcgca ccgaccccag ccgctccggt 600
gcggggcggcg ccatcggcga tatcggcact cacgccttca acgctgctgc ctttgtgacg 660
ggtgaaatcc ccagcagtct ttatgcggat ctcacgtcgt ttgtgccggg ccggcagctg 720
gatgacagcg ccaatattct tttgcgttac gacagtggcg ccaagggcat gctctgggca 780
agccagatcg cggtcggcaa tgaaaatgcg ctgtcactcc gggctctatg cgacaagggc 840
gggcttgaat ggcaccaccg ggtgccggac gagctgtggt tcacgcccta tggcgagccg 900
aagcggctga ttaccgcaa cgggtcgggc gcgggtgccg ctgcaaaccg tgtcagtcgt 960
gtgccatccg ggcacccgga gggatatctc gagggttttg cgacgattta ccgcaagcc 1020
gcagacgcaa tcatcgcaaa gagggaggga gaaacagccg ccggggagggt gatttacc 1080
ggcatggagg acggccttgc gggctctcga ttcatcgatg cggccgttcg ctccagccag 1140
acctcgacct gggtcgggat cgacatctag 1170

```

<210> 4
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 4
 Met Ser Ser Ala Thr Lys Lys Phe Asp Ser Arg Arg Ile Arg Leu Gly
 5 10 15
 Met Val Gly Gly Gly Gln Gly Ala Phe Ile Gly Ala Val His Arg Ile
 20 25 30
 Ala Ala Arg Leu Asp Asp Arg Tyr Glu Leu Val Ala Gly Ala Leu Ser
 35 40 45
 Ser Asp Pro Ala Arg Ala Ala Ala Ser Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60
 Pro Glu Arg Ser Tyr Ala Ser Phe Glu Asp Met Ala Ala Thr Glu Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro Asn His
 85 90 95
 Leu His Phe Ala Pro Ser Lys Ala Phe Leu Glu Ala Gly Ile His Val
 100 105 110
 Ile Cys Asp Lys Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu Glu Ala Lys Ala Leu
 115 120 125
 Ala Gly Ile Val Arg Ala Ser Asp Ser Leu Phe Val Leu Thr His Asn
 130 135 140
 Tyr Thr Gly Tyr Ala Met Leu Arg Gln Met Arg Glu Met Ile Ala Glu
 145 150 155 160
 Gly Ala Ile Gly Lys Leu Arg His Val Gln Ala Glu Tyr Ala Gln Asp
 165 170 175
 Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Lys Thr Gly Ala Lys Gly Ala Glu Trp
 180 185 190
 Arg Thr Asp Pro Ser Arg Ser Gly Ala Gly Gly Ala Ile Gly Asp Ile
 195 200 205
 Gly Thr His Ala Phe Asn Ala Ala Ala Phe Val Thr Gly Glu Ile Pro
 210 215 220

Ser Ser Leu Tyr Ala Asp Leu Thr Ser Phe Val Pro Gly Arg Gln Leu
 225 230 235 240
 Asp Asp Ser Ala Asn Ile Leu Leu Arg Tyr Asp Ser Gly Ala Lys Gly
 245 250 255
 Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Val Tyr Gly Asp Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val
 275 280 285
 Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile
 290 295 300
 Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile
 325 330 335
 Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Glu Thr
 340 345 350
 Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp
 370 375 380
 Val Gly Ile Asp Ile
 385

<210> 5
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 5
 atggctattg aaggaaagac aaccgacgtg gcgaacaagc ggattcgcct cggcatggctc 60
 ggcggcgggtt cgggcgcatt catcggcggc gttcatcgca tggcagcgcg gctcgacaat 120
 cgcttcgatac tcgtggcggg ggccctgtcc tcgacaccgg aaaaatccct agcttccggg 180
 cgtgagctgg ggctcgactc tgagcgttgc tacggctcgt ttgaagaaat ggccgaaaaa 240
 gaagcgcgtgc gcgaggatgg tatcgaggcg gtggcgatcg tcaccccaaa ccatgtgcac 300
 tatcccgctg caaaggcctt cctggagcgc ggcatccatg tcatctgcga caagccgctg 360
 acttccaatc tcgaagacgc gaaaaagctg aaggacgtgg ccgataaggc cgatgcgctg 420
 ttcatcctga cgcataacta caccggttat ccaatggtgc ggcatgcgcg cgagctgggtg 480
 gaggccgggtg cactcggcaa tatccgtctg gtgcaaattg aatatccgca ggactggctg 540
 acggaggcgg tggaacagac cggcgcgaaa caggcagtc tggcgaccga tccggcccaa 600
 tctggcggtg gcggttccac cgggtgacatc ggcacccatg cctataatct cggctgcttc 660
 atttccgggtc tcgaagcgga tgagctggcg gcggatgtgc ataccttct cgaaggccgt 720
 cggctcgatg acaatgctca tgtgatgatg cgcttcaagc ccaagggcgg caagcaaccc 780
 gccaggggca tgctctggtg cagccaggtg gcagtcggcc atgaaaatgg gctgaagatc 840
 cgcttttatg gcgacaaggc cggctctgaa tggacgcagg ccgatccgaa ttatctgtgg 900
 ttacgaagc tcggcgaacc gaagcagttg atcaccgcg gcggggccgg ggcagggggcc 960
 gcagccgctc gcgttaccg cataccctcc ggccatccgg aaggatatct ggaagccttc 1020
 gctaccatct ataccgagc tgcgcatgcc attgaggcgc gccgcaccgg ttcggcgctg 1080
 gataaggcgg tcatttatcc gacggtggat gacggcgtca aaggtgtggc cttcgtcacg 1140
 gcctgcatcg agtcaggcaa gaagaatggc ggctgggtga agctgtaa 1188

<210> 6
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 6
 Met Ala Ile Glu Gly Lys Thr Thr Asp Val Ala Asn Lys Arg Ile Arg
 5 10 15
 Leu Gly Met Val Gly Gly Gly Ser Gly Ala Phe Ile Gly Gly Val His
 20 25 30
 Arg Met Ala Ala Arg Leu Asp Asn Arg Phe Asp Leu Val Ala Gly Ala
 35 40 45
 Leu Ser Ser Thr Pro Glu Lys Ser Leu Ala Ser Gly Arg Glu Leu Gly
 50 55 60
 Leu Asp Ser Glu Arg Cys Tyr Gly Ser Phe Glu Glu Met Ala Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Ala Leu Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro
 85 90 95
 Asn His Val His Tyr Pro Ala Ala Lys Ala Phe Leu Glu Arg Gly Ile
 100 105 110
 His Val Ile Cys Asp Lys Pro Leu Thr Ser Asn Leu Glu Asp Ala Lys
 115 120 125
 Lys Leu Lys Asp Val Ala Asp Lys Ala Asp Ala Leu Phe Ile Leu Thr
 130 135 140
 His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val
 145 150 155 160
 Glu Ala Gly Ala Leu Gly Asn Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro
 165 170 175
 Gln Asp Trp Leu Thr Glu Ala Val Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala
 180 185 190
 Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Val Gly Gly Ser Thr Gly
 195 200 205
 Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu
 210 215 220
 Glu Ala Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Met Arg Phe Lys Pro Lys Gly
 245 250 255
 Gly Lys Gln Pro Ala Arg Gly Met Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val
 260 265 270
 Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Ile Arg Leu Tyr Gly Asp Lys Ala Gly
 275 280 285
 Leu Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu
 290 295 300
 Gly Glu Pro Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr
 325 330 335
 Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu
 340 345 350

Ala Arg Arg Thr Gly Ser Ala Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr
 355 360 365
 Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu
 370 375 380
 Ser Gly Lys Lys Asn Gly Gly Trp Val Lys Leu
 385 390 395

<210> 7
 <211> 1077
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis

<400> 7
 ttgataacgc ttttaaaggg gagaagaaaa gtggatacga tcaaggttgg aatattagga 60
 tacggattgt ccggttctgt ttttcacggg ccgctgctgg atgttctgga tgaatatcaa 120
 atcagcaaaa tcatgacatc acggacagaa gaagtgaaac gggattttcc agatgctgag 180
 gttgtacatg agcttgaaga aatcacaaat gaccctgccca ttgagcttgt cattgtcacc 240
 accccgagcg gccttcatta cgagcatact atggcatgca tacaggccgg aaaacatgtt 300
 gtgatggaaa aaccaatgac agcaacggcc gaagaggggg aacattaaa aagggctgcc 360
 gatgaaaaag gcgtattatt aagcgtatat cataaccgac gctgggataa cgatttttta 420
 acgattaaaa agctgatctc tgagggatcc ctigaagata tcaatacata tcaagtttcc 480
 tataaccgct acagacctga agttcaagcg cgggtggcggg aaaaagaagg cactgccact 540
 ggtacgctgt atgatctcgg ctcccacatc atagaccaa ccctgcattt gtttgggatg 600
 cctaaagccg tgactgcaaa cgtgatggcc cagcgggaaa atgccgaaac ggttgactat 660
 tttcatttaa ccctggatta tggcaagctt caagccattc tatacggagg atcaatcggt 720
 ccggcaaacg gacctcggtt tcaaatccat ggaaaagatt ctagctttat caaatatgga 780
 attgacggac aggaagacgc actcagagcg ggaagaaaac cagaggatga cagctggggt 840
 gcggatgttc cggagtttta cggaaagctt acaaccattc gtggctccga caaaaaaaca 900
 gaaacgattc catcagtaaa tggctcctac cttacttatt accgtaaaat agcggaaagc 960
 atacgagaag gtgctgcgct gccagtcact gctgaggaag gtattaatgt catccgcac 1020
 attgaagccg cgatggaaag cagtaaagag aaacgaacca ttatgctgga gcactaa 1077

<210> 8
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 8
 Met Ile Thr Leu Leu Lys Gly Arg Arg Lys Val Asp Thr Ile Lys Val
 5 10 15
 Gly Ile Leu Gly Tyr Gly Leu Ser Gly Ser Val Phe His Gly Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asp Val Leu Asp Glu Tyr Gln Ile Ser Lys Ile Met Thr Ser Arg
 35 40 45
 Thr Glu Glu Val Lys Arg Asp Phe Pro Asp Ala Glu Val Val His Glu
 50 55 60
 Leu Glu Glu Ile Thr Asn Asp Pro Ala Ile Glu Leu Val Ile Val Thr
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Gly Leu His Tyr Glu His Thr Met Ala Cys Ile Gln Ala
 85 90 95

Gly Lys His Val Val Met Glu Lys Pro Met Thr Ala Thr Ala Glu Glu
 100 105 110
 Gly Glu Thr Leu Lys Arg Ala Ala Asp Glu Lys Gly Val Leu Leu Ser
 115 120 125
 Val Tyr His Asn Arg Arg Trp Asp Asn Asp Phe Leu Thr Ile Lys Lys
 130 135 140
 Leu Ile Ser Glu Gly Ser Leu Glu Asp Ile Asn Thr Tyr Gln Val Ser
 145 150 155 160
 Tyr Asn Arg Tyr Arg Pro Glu Val Gln Ala Arg Trp Arg Glu Lys Glu
 165 170 175
 Gly Thr Ala Thr Gly Thr Leu Tyr Asp Leu Gly Ser His Ile Ile Asp
 180 185 190
 Gln Thr Leu His Leu Phe Gly Met Pro Lys Ala Val Thr Ala Asn Val
 195 200 205
 Met Ala Gln Arg Glu Asn Ala Glu Thr Val Asp Tyr Phe His Leu Thr
 210 215 220
 Leu Asp Tyr Gly Lys Leu Gln Ala Ile Leu Tyr Gly Gly Ser Ile Val
 225 230 235 240
 Pro Ala Asn Gly Pro Arg Tyr Gln Ile His Gly Lys Asp Ser Ser Phe
 245 250 255
 Ile Lys Tyr Gly Ile Asp Gly Gln Glu Asp Ala Leu Arg Ala Gly Arg
 260 265 270
 Lys Pro Glu Asp Asp Ser Trp Gly Ala Asp Val Pro Glu Phe Tyr Gly
 275 280 285
 Lys Leu Thr Thr Ile Arg Gly Ser Asp Lys Lys Thr Glu Thr Ile Pro
 290 295 300
 Ser Val Asn Gly Ser Tyr Leu Thr Tyr Tyr Arg Lys Ile Ala Glu Ser
 305 310 315 320
 Ile Arg Glu Gly Ala Ala Leu Pro Val Thr Ala Glu Glu Gly Ile Asn
 325 330 335
 Val Ile Arg Ile Ile Glu Ala Ala Met Glu Ser Ser Lys Glu Lys Arg
 340 345 350
 Thr Ile Met Leu Glu His
 355

<210> 9
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium sp.

<400> 9
 atgtcctccg caccaaaaaa attcgacagc cgccgtatcc gtctcggaat ggtcggcggc 60
 ggtcagggcg cctttatcgg tgcggtgcac cgcatagcgg cccggctgga tgaccgttac 120
 gagctcgtgg ccggagcgct ttcttccgat cccgcgcgtg cggccgcttc ggcaaccctg 180
 ctcggcatcg cgccggagcg ttcctatgcc tcattcgagg agatggctgc ggcagaggcc 240
 ggtcggagacg acggtatcga ggcagtcgcc atcgtgacgc ccaatcacct ccattttgcg 300
 ccctcaaagg cttttctcga ggccggtatt cacgtcatct gcgacaagcc tgtgaccgcg 360
 acacttgagg aagcaaaggc gctggccgag atcgtcaggg cgtcggacag cctgtttgtc 420
 ctgacgcata attacaccgg ctacgccatg ctgcggcaga tgcggcagat ggtggctgat 480
 ggagccattg gcaagctgcg ccacgttcag gccgaatatg cccaggactg gctgaccgag 540

出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 7 4 7 4

Met Leu Trp Ala Ser Gln Ile Ala Val Gly Asn Glu Asn Ala Leu Ser
 260 265 270
 Leu Arg Val Tyr Gly Glu Lys Gly Gly Leu Glu Trp His His Arg Val
 275 280 285
 Pro Asp Glu Leu Trp Phe Thr Pro Tyr Gly Glu Pro Lys Arg Leu Ile
 290 295 300
 Thr Arg Asn Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Asn Arg Val Ser Arg
 305 310 315 320
 Val Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr Leu Glu Gly Phe Ala Thr Ile
 325 330 335
 Tyr Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ile Ile Ala Lys Arg Glu Gly Lys Ala
 340 345 350
 Ala Ala Gly Glu Val Ile Tyr Pro Gly Met Glu Asp Gly Leu Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ala Phe Ile Asp Ala Ala Val Arg Ser Ser Gln Thr Ser Thr Trp
 370 375 380
 Ile Asn Ile Asp Ile
 385

<210> 11
 <211> 1188
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium sp.

<400> 11
 atggctattg aaggaaagac aaccgacaag gcgaacaagc ggattcgcct cggcatgggtg 60
 ggcggtgggt ctggtgcctt tatcgggtgggt gttcaccgca tggcggcgcg gctcgacaat 120
 cgtttcgatc tcgtggcagg ggcgctgtct tcgaccccg aaaaatccct cgcctccggc 180
 cgtgaactgg ggctcgatcc cgagcgttgc tacggctcgt tcgaggagat ggccgaaaag 240
 gaggcgctac gcgaggatgg catagaggcg gtggcgatcg tcacgcccac ccacgtgcat 300
 tatccggcgg cgaaggcggt tctggagcgt ggcatccatg tcatctgcga caagccgctg 360
 acctccaatc tggaagacgc gaagaagctg aaggacgtcg ccgacaaggc cgatgcgctg 420
 ttcatcctga cgcataatta caccggctat ccgatgggtg ggcatgcacg ggaactgggtg 480
 gaatcgggcg ctctcggcac gatccgtctg gtgcagatgg agtatccgca ggactggctg 540
 gcggaaccca tcgagcagac gggcgccaaa caggctgtct ggcgaccga cccggcccaa 600
 tccggtgcgg gtggttccac aggcgatatc ggcacgcatg cctataatct cggctgcttc 660
 atttccgggtc tggaagtcga cgaactggcg gcagatgtgc ataccttgt cgaaggccgc 720
 cggctggacg acaatgcgca tgtgatgctg cgtttcaagc cgaagggtgg caagcagccg 780
 gcaaaggggc tgctctgggt cagccagggt gcggtcggcc acgaaaacgg cctgaaagtt 840
 cgtgtgtatg gtgacaaggc cggcatcgaa tggacgcagg ccgaccgaa ctatctctgg 900
 ttcacgaagc ttggcgagct gaagcagttg atcaccgcg gcggtgccgg ggcagggggt 960
 gccgcagcac gcgtcaccg catcccttcc ggccaccgga aaggttatct cgaagccttc 1020
 gcaacgatct ataccgaggc ggcgcatgcc atcgaagccc gccgcaccgg ctcggtgctc 1080
 gacaaggccg tgatttacc gaccgtcgat gatggcgtaa aggggtgtcg ctttgttacg 1140
 gcctgcatcg agtccggcaa gaagaacggt gtctgggtga agctgtaa 1188

<210> 12
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Agrobacterium sp.

<400> 12
Met Ala Ile Glu Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ala Asn Lys Arg Ile Arg
5 10 15
Leu Gly Met Val Gly Gly Gly Ser Gly Ala Phe Ile Gly Gly Val His
20 25 30
Arg Met Ala Ala Arg Leu Asp Asn Arg Phe Asp Leu Val Ala Gly Ala
35 40 45
Leu Ser Ser Thr Pro Glu Lys Ser Leu Ala Ser Gly Arg Glu Leu Gly
50 55 60
Leu Asp Pro Glu Arg Cys Tyr Gly Ser Phe Glu Glu Met Ala Glu Lys
65 70 75 80
Glu Ala Leu Arg Glu Asp Gly Ile Glu Ala Val Ala Ile Val Thr Pro
85 90 95
Asn His Val His Tyr Pro Ala Ala Lys Ala Phe Leu Glu Arg Gly Ile
100 105 110
His Val Ile Cys Asp Lys Pro Leu Thr Ser Asn Leu Glu Asp Ala Lys
115 120 125
Lys Leu Lys Asp Val Ala Asp Lys Ala Asp Ala Leu Phe Ile Leu Thr
130 135 140
His Asn Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Val Arg His Ala Arg Glu Leu Val
145 150 155 160
Glu Ser Gly Ala Leu Gly Thr Ile Arg Leu Val Gln Met Glu Tyr Pro
165 170 175
Gln Asp Trp Leu Ala Glu Pro Ile Glu Gln Thr Gly Ala Lys Gln Ala
180 185 190
Val Trp Arg Thr Asp Pro Ala Gln Ser Gly Ala Gly Gly Ser Thr Gly
195 200 205
Asp Ile Gly Thr His Ala Tyr Asn Leu Gly Cys Phe Ile Ser Gly Leu
210 215 220
Glu Val Asp Glu Leu Ala Ala Asp Val His Thr Phe Val Glu Gly Arg
225 230 235 240
Arg Leu Asp Asp Asn Ala His Val Met Leu Arg Phe Lys Pro Lys Gly
245 250 255
Gly Lys Gln Pro Ala Lys Gly Leu Leu Trp Cys Ser Gln Val Ala Val
260 265 270
Gly His Glu Asn Gly Leu Lys Val Arg Val Tyr Gly Asp Lys Ala Gly
275 280 285
Ile Glu Trp Thr Gln Ala Asp Pro Asn Tyr Leu Trp Phe Thr Lys Leu
290 295 300
Gly Glu Leu Lys Gln Leu Ile Thr Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala
305 310 315 320
Ala Ala Ala Arg Val Thr Arg Ile Pro Ser Gly His Pro Glu Gly Tyr
325 330 335
Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ile Tyr Thr Glu Ala Ala His Ala Ile Glu
340 345 350
Ala Arg Arg Thr Gly Ser Val Leu Asp Lys Ala Val Ile Tyr Pro Thr
355 360 365
Val Asp Asp Gly Val Lys Gly Val Ala Phe Val Thr Ala Cys Ile Glu
370 375 380

Ser Gly Lys Lys Asn Gly Val Trp Val Lys Leu
385 390 395

<210> 13
<211> 1059
<212> DNA
<213> *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

<400> 13
atgcctaaac cattcaatct ggccgtcgtc ggctatggct atgttggccg caccttcac 60
gcaccgctga tcgccagcac gcccggcctg cagttgcaca gcgtggtgtc gtccaagccg 120
cagcaaccgc aggcggaactt ccgcgaggtg cgcgtgctgc ccgacctgga ggctgcaactg 180
gccgaccccg cgctggatgc ggtggtcatc gccacgcca accagacca tgcgcccattg 240
gcgctgcagg cactggcggc cggcaagcac gtgctggtgg ataaaccctt cgccctggat 300
gccgcacagg ctcgcaccgt ggtggacgcc gccgcagagg ccggcaagat cgtcagcgtg 360
ttccagaacc gccgttggga tgcggacttc ctcaccgtgc ggcgcttgat cgaagacggc 420
caactggggcg aggtggtgga gttccattcg cacttcgacc ggtatcgccc gcaggtgcgc 480
gaccgctggc gcgaaagcga tatccccggc gccgggctgt ggtacgacct ggggcccgc 540
ctgctggacc aggcgttgca gttgttcggc atgccgcagg cgatcagcgc agacctgcag 600
cgccagcgca cccaggcgcg cagcgacgat tacttcaacg tggctgctgcg ctatccccgc 660
ttgcgggtga tcctgcacgc cggctcgctg gtggccgacg gcagcctgcg cttcgccgtg 720
cacggcacgc gcggcagcta tctcaagcat ggcgccgata cgcaggaaga ccagttgcgt 780
gccggccgcc ggcccggcac cgccggctgg ggcatggacc cattgcccg cagctcacc 840
cgctggtgac acgaaggccg tgtgcacacg catcagcccg atggcgctacc cggcgactac 900
cgccattgct atgcggcctt ccgcgacgca atggccggca ccgcaccgcc accggtcagt 960
gctgccgacg cgggtgcggct gatggagctg ctggagctgg cgcaacgcgg tgctgcgctg 1020
ggccaggtgc tctggctgga aggcaacagc agcgactga 1059

<210> 14
<211> 352
<212> PRT
<213> *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

<400> 14
Met Pro Lys Pro Phe Asn Leu Ala Val Val Gly Tyr Gly Tyr Val Gly
5 10 15
Arg Thr Phe His Ala Pro Leu Ile Ala Ser Thr Pro Gly Leu Gln Leu
20 25 30
His Ser Val Val Ser Ser Lys Pro Gln Gln Pro Gln Ala Asp Phe Arg
35 40 45
Glu Val Arg Val Leu Pro Asp Leu Glu Ala Ala Leu Ala Asp Pro Ala
50 55 60
Leu Asp Ala Val Val Ile Ala Thr Pro Asn Gln Thr His Ala Pro Met
65 70 75 80
Ala Leu Gln Ala Leu Ala Ala Gly Lys His Val Leu Val Asp Lys Pro
85 90 95
Phe Ala Leu Asp Ala Ala Gln Ala Arg Thr Val Val Asp Ala Ala Ala
100 105 110
Glu Ala Gly Lys Ile Val Ser Val Phe Gln Asn Arg Arg Trp Asp Ala

115	120	125
Asp Phe Leu Thr Val Arg Arg Leu Ile Glu Asp Gly Gln Leu Gly Glu		
130	135	140
Val Val Glu Phe His Ser His Phe Asp Arg Tyr Arg Pro Gln Val Arg		
145	150	155
Asp Arg Trp Arg Glu Ser Asp Ile Pro Gly Ala Gly Leu Trp Tyr Asp		
165	170	175
Leu Gly Pro His Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Leu Phe Gly Met Pro		
180	185	190
Gln Ala Ile Ser Ala Asp Leu Gln Arg Gln Arg Thr Gln Ala Arg Ser		
195	200	205
Asp Asp Tyr Phe Asn Val Val Leu Arg Tyr Pro Arg Leu Arg Val Ile		
210	215	220
Leu His Ala Gly Ser Leu Val Ala Asp Gly Ser Leu Arg Phe Ala Val		
225	230	235
His Gly Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Lys His Gly Ala Asp Thr Gln Glu		
245	250	255
Asp Gln Leu Arg Ala Gly Arg Arg Pro Gly Thr Ala Gly Trp Gly Met		
260	265	270
Asp Pro Leu Pro Gly Thr Leu Thr Arg Val Asp Asp Glu Gly Arg Val		
275	280	285
His Thr His Gln Pro Asp Gly Val Pro Gly Asp Tyr Arg His Cys Tyr		
290	295	300
Ala Ala Phe Arg Asp Ala Met Ala Gly Thr Ala Pro Pro Pro Val Ser		
305	310	315
Ala Ala Asp Ala Val Arg Leu Met Glu Leu Leu Glu Leu Ala Gln Arg		
325	330	335
Gly Ala Ala Leu Gly Gln Val Leu Trp Leu Glu Gly Asn Ser Ser Asp		
340	345	350

<210>15

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence : ydgj-F

<400>15

cattcaagct taatgagagg caatgacatg agcg

34

<210>16

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence : ydgj-R

<400>16
tcggaattct tcatgcaagg cacaaagtcg c

31

<210>17
<211>32
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Description of Artificial Sequence : Atu4375-F

<400>17
ggcggatcct ttgaaaggga tagtcatgtc ct

32

<210>18
<211>30
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Description of Artificial Sequence : Atu4375-R

<400>18
attggaagct tcgattggct gcgacctag

30

<210>19
<211>31
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223>Description of Artificial Sequence : Atu3234-F

<400>19
ttgggatcct ttcaggggaa atattatgg c

31

<210>20
<211>26
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : Atu3234-R

<400>20
gccgcaagct tgttttacag cttcac

26

<210>21
<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : BG14057-F

<400>21

aggaattcga tgataacgct tttaaagggg agaa

34

<210>22

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : BG14057-R

<400>22

tttctgcagt ttagtgctcc agcataatgg ttcg

34

<210>23

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Xcc3438-F

<400>23

tcggaattcg cgttgcggtg aatcgttttc aatg

34

<210>24

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Xcc3438-R

<400>24

ataagaagct tgctcagtcg ctgctgttgc cttc

34

<210>25

<211>35

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : BG10669-F

<400>25
ttgggatccg atgagtttac gtattggcgt aattg

35

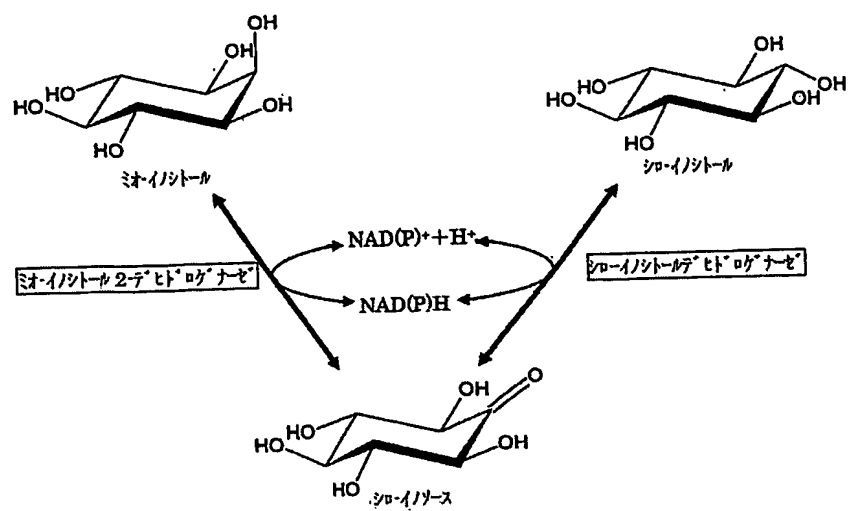
<210>26
<211>39
<212>DNA
<213>Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : BG10669-R

<400>26
aaactgcagt tagttttgaa ctgttgtaaa agattgata

39

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】****【課題】**

安価なミオーイノシトールから、直接に酵素変換のみで、短時間、高収量でシロイノシトールを得る方法、すなわち、シロイノソースのような中間体の単離や、化学還元試薬を使用せずに、高純度のシロイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供すること。

【解決手段】

シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼとそれをコードするDNAを提供すること、及び、当該酵素を利用し、高純度のシロイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供すること。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-194088
受付番号	50401104820
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 7月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 6月30日

特願 2 0 0 4 - 1 9 4 0 8 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 4 2 0 0 2]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本石町 4 丁目 4 番 2 0 号

氏 名 北興化学工業株式会社